ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904) A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
G. RAMON,

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : **A. BOQUET.**

TOME SOIXANTE-TROISIÈME

Juillet-Décembre 1939

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS — ANCNE IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1939

T. 63 JUILLET 1939 N° 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ŒUVRES DE PASTEUR

RÉUNIES PAR PASTEUR VALLERY-RADOT.

Tome VII, *Mélanges scientifiques et littéraires (Index analytique et synthétique de l'œuvre de Pasteur)* (1).

Au lendemain du cinquantenaire de la fondation de l'Institut Pasteur, les *Annales* se doivent de signaler à leurs lecteurs que le tome VII et dernier des œuvres de Pasteur vient de paraître.

Pieusement recueillies par M. Pasteur Vallery-Radot au foyer même où elles ont été élaborées ; collationnées et classées avec le souci filial de rendre éclatant aux yeux de tous le splendide et harmonieux développement d'un incomparable génie ; présentées dans un cadre parfait, ces œuvres nous donnent, après celle de René Vallery-Radot, une nouvelle « Vie de Pasteur » écrite feuille à feuille, presque jour à jour, par le Maître, aux heures paisibles et sereines de la méditation qui succède au bouillonnement des idées créatrices et aux émotions de la recherche. Elles sont aussi, pour tous les pastoriens et pour tous les travailleurs qui ont orienté leur activité intellectuelle vers l'étude de la Bactériologie et de la Pathologie expérimentale des infections microbiennes, un monument scientifique du style le plus pur, d'une

(1) 1 vol. gr. in-8° de 666 pages Paris, Masson et Cie, édit., 1939.

puissance et d'une majesté sans égales, une Somme impérissable, la plus noble, la plus féconde et la plus généreuse expression de la pensée.

Il faut relire cette épopée dont chaque chant retrace un épisode de la lutte entreprise par un homme-dieu, comme aux temps légendaires de la Grèce dorienne, pour délivrer l'Humanité des maux terrifiants qui l'accablent, et aussi pour porter plus loin le flambeau qui guide sa marche indécise.

Il faut la relire pour s'éclairer à cette lumière, rectifier son jugement, affiner et polir sa raison ; pour se purifier des péchés de vanité et d'orgueil à cette source de sagesse, s'améliorer et se grandir. Et aussi pour goûter l'enchantement d'une œuvre littéraire d'une exceptionnelle beauté, où Pasteur se retrouve tout entier : attentif et grave, volontaire et pensif, avec toute sa force, son courage et sa flamme, sa prodigieuse intelligence, sa fermeté inébranlable, sa confiance en l'avenir, sa foi et sa passion d'adoucir le sort des hommes par les conquêtes de son esprit.

Ecoutons sa voix et suivons ses conseils dont voici quelques-uns :

Sur la formation des travailleurs dans les laboratoires.
L'esprit pastorien.

« Nous pouvons avoir la plus salutaire influence sur l'éducation intellectuelle et morale de nos élèves dans cette communion d'idées nécessitée par les travaux pratiques des laboratoires... Combien de notions saines, de sages habitudes d'observation, combien de prudence dans les inductions à tirer des faits qu'ils étudient, ne pouvons-nous pas inculquer dans ces jeunes esprits dont les impressions sont si vives ? Aussi bien, pour que cet enseignement porte tous ses fruits, faut-il que les maîtres aient développé en eux-mêmes et porté à une grande hauteur, par le travail patient du laboratoire dans des études originales, toutes les qualités que je viens de signaler. » (Ecrit en 1855, T. VII, p. 137.)

Sur le domaine de l'expérimentation.

« L'expérimentateur, homme de conquêtes sur la nature, se trouve sans cesse aux prises avec des faits qui ne se sont point

encore manifestés et n'existent, pour la plupart, qu'en puissance de devenir dans les lois naturelles. L'inconnu dans le possible et non dans ce qui a été, voilà son domaine, et, pour l'explorer, il a le recours de cette merveilleuse méthode expérimentale dont on peut dire avec vérité, non qu'elle suffit à tout, mais qu'elle trompe rarement et ceux-là seulement qui s'en servent mal. Elle élimine certains faits, en provoque d'autres, interroge la nature, la force à répondre, et ne s'arrête que quand l'esprit est pleinement satisfait. Le charme de nos études, l'enchantement de la science, si l'on peut parler ainsi, consiste en ce que, partout et toujours, nous pouvons donner la justification de nos principes et la preuve de nos découvertes. »

(Discours de réception à l'Académie française, 27 avril 1882, T. VII, p. 334.)

A propos de l'éloquence dans la relation des faits scientifiques.

« Croyez-vous donc que je sois insensible à l'éloquence ! Mais je la veux dans les faits et point dans les mots.

En est-il de plus haute que celle qui ressort de l'exposition claire, précise, imagée même, si vous le voulez, de faits nouveaux et féconds ?

Apportez ici ce genre d'éloquence et j'y applaudirai. Ce que je redoute pour cette Académie, c'est l'éloquence des idées, ou des dissertations qui sont des déductions d'hypothèses ou de conjectures et non l'expression ou la déduction de faits rigoureux bien observés.

Sans doute, la médecine n'a pas des principes aussi assurés que beaucoup d'autres sciences. L'observation et l'expérimentation y sont plus difficiles. L'esprit de déduction doit intervenir plus souvent qu'en physique et en chimie par exemple. C'est une raison de plus pour y craindre la pente glissante de l'hypothèse et des idées préconçues. Quand on s'y livre, c'est ce que j'appelle *discourir*, comme on appelle *discoureur* celui qui parle sur des on-dit, sur des banalités ou des à peu près. »

(Ecrit en 1875, T. VII, p. 296.)

Gardez votre enthousiasme et ayez le culte de l'esprit critique.

« Cet enthousiasme, que vous avez eu dès la première heure, gardez-le, chers collaborateurs, mais donnez-lui pour compagnon

inséparable un sévère contrôle. N'avancez rien qui ne puisse être prouvé d'une façon simple et décisive. Ayez le culte de l'esprit critique. Réduit à lui seul, il n'est ni un éveilleur d'idées, ni un stimulant de grandes choses. Sans lui, tout est caduc. Il a toujours le dernier mot. Ce que je vous demande là et ce que vous demanderez à votre tour aux disciples que vous formerez, est ce qu'il y a de plus difficile à l'inventeur. Croire que l'on a trouvé un fait scientifique important, avoir la fièvre de l'annoncer et se contraindre des journées, des semaines, parfois des années à se combattre soi-même, à s'efforcer de ruiner ses propres expériences, et ne proclamer sa découverte que lorsqu'on a épuisé toutes les hypothèses contraires, oui, c'est une tâche ardue. Mais quand, après tant d'efforts, on est enfin arrivé à la certitude, on éprouve une des plus grandes joies que puisse ressentir l'âme humaine, et la pensée que l'on contribuera à l'honneur de son pays rend cette joie plus profonde encore. Si la science n'a pas de patrie, l'homme de science doit en avoir une, et c'est à elle qu'il doit reporter l'influence que ses travaux peuvent avoir dans le monde. »

(Discours prononcé à l'inauguration de l'Institut Pasteur le 14 novembre 1888, T. VII, p. 419.)

Une table chronologique, une table des noms cités et un index analytique et synthétique terminent le tome VII des *Œuvres de Pasteur*. L'index, en particulier, permettra au lecteur de se reporter facilement à la source même des sujets qui l'intéressent plus spécialement dans cet immense Recueil que nous devons à la piété et à la vénération du petit-fils de Pasteur.

A. Boquet.

ACTION EMPÊCHANTE DES FOYERS INFLAMMATOIRES SUR L'ÉVOLUTION DU CHARBON BACTÉRIDIEN

par ALFRED BOQUET et NICOLAS STAMATIN.

(*Institut Pasteur.*)

Sous le nom d'antagonisme microbien, on désigne, depuis de Bary (1879), l'action que certains germes, pathogènes ou non, exercent sur des microbes d'espèces différentes en mettant obstacle à leur végétation *in vitro* ou en entravant leur développement *in vivo*, atténuant ainsi ou même inhibant complètement les troubles locaux ou généraux qu'ils provoquent d'ordinaire lorsqu'ils interviennent seuls. En ce qui concerne la bactéridie charbonneuse, ces deux modalités de l'antagonisme microbien se manifestent avec une telle netteté que, déjà signalées en 1877 et 1880 par Pasteur, elles ont été depuis l'objet d'un très grand nombre d'observations et de recherches expérimentales.

En 1886, Emmerich démontrait que si l'on inocule des streptocoques sous la peau du lapin, avant ou après des bactéridies virulentes, on prévient l'évolution du charbon. Peu après, des résultats analogues furent également obtenus avec le Pneumocoque et le Pneumobacille de Friedländer (Pawlowsky, 1887), le Vibrion cholérique (Zagari, 1887), le Staphylocoque (Pawlowsky, 1887 ; di Mattei, 1889 ; Beco, 1895 ; Emmerich et Low, Woodhead et Cartwright Wood, 1889), le Bacille du rouget du Porc (Alonzo, 1892) et même avec des germes saprophytes comme le *M. prodigiosus* (Pawlowsky, H. Roger, 1895).

Assez négligée depuis la guerre, l'étude de ce phénomène fut cependant reprise de temps à autre à propos des effets empêchants du Bacille pyocyanique, du *B. coli*, du Bacille typhique, du Streptocoque et du Staphylocoque (W. Silberschmidt et E. Schoch, 1920 ; M. Gundel et H. Khewe, 1932 ;

M. P. Isabolinsky et R. M. Sobelewa, 1934), du vaccin jennérien (Fürst, 1930) et du virus sensibilisé de la clavelée (Jézic, 1936) sur le développement de l'infection charbonneuse. Les récentes recherches de Besredka sur la *bactériothérapie locale* s'appliquent à des faits de même ordre relatifs à l'antagonisme entre le Streptocoque et le deuxième vaccin charbonneux dans l'organisme du lapin.

Diverses notions de grande importance furent ainsi graduellement acquises. On reconnut, par exemple, que l'action empêchante des germes associés à la bactéridie ne se manifeste que si les deux microbes sont inoculés en mélange sous la peau ou l'un après l'autre, à bref délai, au même point ; mais elle n'est pas liée à la vitalité et à la pullulation du germe antagoniste, car Buchner (1890), puis H. Roger (1895) démontrèrent que les cultures tuées du bacille de Friedländer et du *M. prodigiosus* s'opposent avec la même efficacité que les cultures vivantes à la végétation *in vivo* de la bactéridie. Plus encore, d'après Freudenreich (1889), Woodhead et Cartwright Wood (1889), Delarbre (1906) et Fortineau (1910), les cultures stérilisées et la toxine du bacille pyocyanique, lorsqu'elles sont injectées sous la peau après la bactéridie, seraient capables de ralentir, voire d'empêcher l'évolution du charbon.

Pour Silberschmidt et Schoch, les animaux protégés par un germe antagoniste n'acquièrent aucune résistance contre l'infection charbonneuse. A. Besredka, au contraire, a réussi à mettre en évidence une véritable immunité chez des lapins qui avaient reçu, huit jours auparavant, dans la peau ou sous la peau, soit des bactéridies et des streptocoques simultanément en mélange, soit des bactéridies puis des streptocoques, à trois ou six heures d'intervalle. Dans le même ordre de faits, N. Blagovestschensky avait déjà réussi, en 1890, à immuniser contre le charbon 4 lapins sur 6 en leur inoculant sous la peau d'abord « 1 cent. cube de culture charbonneuse et ensuite, autour du point d'injection, à la distance d'un centimètre... de 1/2 jusqu'à 1 cent. cube de culture stérilisée de pus bleu dans du bouillon. Ces dernières inoculations

furent répétées toutes les vingt-quatre heures pendant quatre ou cinq jours ».

Maintes hypothèses ont été émises, qui se proposaient d'expliquer le mécanisme physiologique de l'antagonisme microbien. Les unes tendaient à faire intervenir les effets nocifs, pour la bactéridie, des produits sécrétés par les microbes associés, les autres invoquaient une sorte de concurrence entre les germes, assez mal définie d'ailleurs et comparée par Silberschmidt et Schoch à l'action empêchante que, d'après Metchnikoff, certaines bactéries du tube digestif exercent sur le développement de l'infection cholérique expérimentale chez le lapin. N. Blagovestschensky pensait que l'atténuation de la bactéridie due à des substances émises *in vivo* par le bacille pyocyanique « facilite peut-être l'activité des phagocytes, activité à laquelle viendraient s'ajouter encore d'autres facteurs ». Avec plus de précision, Von Dungern concluait que « lorsque l'infection charbonneuse ne se généralise pas grâce à l'influence des bactéries encapsulées de Friedländer, cela dépend de ce que les bactéridies sont englobées au point d'inoculation et détruites à l'intérieur de ces cellules ».

Dans la suite, l'attention des chercheurs s'étant détournée de ce problème, la littérature scientifique se borna à enregistrer l'antagonisme *in vivo* parmi les effets des associations microbiennes, dont G. Papacostas et J. Gaté ont fait, en 1928, un remarquable exposé d'ensemble. Le phénomène était étudié en soi, comme un cas spécial de la concurrence vitale, dans le vaste chapitre des infections mixtes et des infections secondaires, mais, sauf E. Metchnikoff dans son ouvrage fondamental sur l'immunité (1901), on ne se préoccupa guère, jusqu'à ces dernières années, de le situer dans le cadre des réactions tissulaires aux infections, ni de le comparer aux phénomènes similaires décrits depuis longtemps par Klein (1893), Sobernheim, Issaeff (1894) et J. Bordet (1897) sur le rôle protecteur des réactions inflammatoires du tissu conjonctif sous-cutané et du péritoine à l'égard des effets pathogènes du vibrion cholérique et du streptocoque.

C'est André Gratia qui, le premier (1924), eut l'idée de

rechercher comment la bactéridie charbonneuse se comporte dans l'organisme du cobaye quand le tégument où elle est inoculée est « protégé par une mobilisation préalable des facteurs de la phagocytose », en dehors de toute association microbienne. Gratia prépare une série de cobayes en leur injectant du bouillon dans la peau de l'abdomen et, trente-six heures après, il leur inocule, dans le tissu conjonctif de la même région, de 0 c. c. 001 à 0 c. c. 00001 de culture en bouillon de bactéridie, en même temps qu'à des témoins. Ceux-ci meurent de charbon en quatre ou cinq jours. Au contraire, les cobayes préparés supportent sans dommage les doses de 0 c. c. 00001 et même 0 c. c. 0001. Ne contractent le charbon que ceux qui ont reçu la plus forte dose d'épreuve, c'est-à-dire 0 c. c. 001.

En essayant de vérifier si la résistance des cobayes tuberculeux à l'infection charbonneuse, mise en évidence par Hiramaya, est plus ou moins sous la dépendance de réactions allergiques locales, non spécifiques, l'un de nous, avec C. Ninni et J. Bretey (1932), a constaté les faits suivants :

Quel que soit le degré de leur sensibilité allergique et même s'ils ont été, au préalable, désensibilisés par des injections de tuberculine, les cobayes tuberculeux qui reçoivent dans le derme 0 c. c. 1 d'une dilution de tuberculine brute à 1 p. 10 et, vingt-quatre heures plus tard, au même point, de 1/200^e à 1/400^e de centimètre cube de deuxième vaccin charbonneux, résistent pour la plupart, alors que tous les cobayes témoins meurent de charbon. Mais les cobayes neufs que l'on éprouve comme les précédents, vingt-quatre heures après une injection intradermique de tuberculine, échappent à l'infection charbonneuse dans les mêmes proportions que les cobayes tuberculeux.

L'effet protecteur que la réaction inflammatoire produite par la tuberculine exerce ainsi à l'égard du charbon bactéridien, *est strictement limité à la petite zone intéressée par l'injection préparante*. Déjà manifeste à partir de la douzième heure après cette injection, il atteint son intensité maximum vers la vingt-quatrième heure et cesse vers la quarante-huitième heure. Aucune immunité n'apparaît dans la suite,

même lorsqu'on répète l'injection virulente trois ou quatre fois tous les huit ou dix jours à doses croissantes, en zone préparée.

Dans les mêmes conditions, les protéides précipités par l'acide trichloracétique des cultures de bacilles de Koch protègent 3 cobayes neufs sur 4 contre l'inoculation, faite vingt-quatre heures plus tard, au même point de la peau, de 1/300e de centimètre cube de deuxième vaccin charbonneux ; le bouillon peptoné fraîchement préparé, 3 cobayes sur 4 ; le BCG vivant et des bacilles tuberculeux virulents tués par la chaleur, à la dose de 1 milligramme, 3 cobayes sur 5 ; une solution de gomme arabique à 5 p. 100, l'eau salée à 3 p. 100 et le sérum de cheval, 1 cobaye sur 3. Se sont montrées inefficaces, bien que dans quelques cas le développement de l'infection charbonneuse ait été retardé : l'eau peptonée à 1 et 5 p. 100, une décoction de mie de pain, l'encre de Chine et l'eau physiologique. Enfin, tous les cobayes infectés par inoculation de deuxième vaccin charbonneux à la même dose que les précédents, mais dans une région de la peau simplement épilée et rasée, ou fortement contusionnée par écrasement vingt-quatre heures auparavant, sont morts de charbon dans les mêmes délais que les témoins.

Les recherches que nous avons effectuées récemment et qui font l'objet de ce mémoire, nous ont conduits à examiner chez le lapin les effets antagonistes d'autres substances, de certaines toxines microbiennes et de bactéries vivantes ou tuées. Elles nous ont permis de suivre le sort de la bactéridie charbonneuse dans les foyers inflammatoires et de vérifier si l'infection ainsi « escamotée », selon l'expression pittoresque de notre collègue Staub, s'accompagne ou non d'une immunité spécifique appréciable.

I — Inoculation intradermique ou sous-cutanée de bactéridies en suspension dans un liquide inflammatoire ou mélangées extemporanément avec des germes microbiens.

La souche de bactéridie que nous avons employée dans toutes nos expériences a été isolée le 21 janvier 1938, à l'Institut Pasteur de Bucarest, du cadavre d'un cheval charbonneux. Elle donne en vingt-quatre heures, dans le bouillon, une culture abondante et homogène qui contient environ 5.000.000 de germes par centimètre cube.

Douée d'une très haute virulence, cette souche, inoculée par voie dermique, tue régulièrement le lapin de 2 kilogrammes à 2 kilogr. 500 en deux ou trois jours à la dose de 0 c. c. 000025 et le cobaye en trois à cinq jours à la dose de 0 c. c. 000.001 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures.

A. — Bactéridies en suspension dans une dilution de toxine staphylococcique.

Au moment de l'emploi, la toxine staphylococcique (1) est diluée à 1 p. 100 ou à 1 p. 1.000 dans de l'eau physiologique. L'injection intradermique de 1 cent. cube de l'une ou l'autre de ces dilutions détermine chez le lapin la formation sur place d'un œdème inflammatoire plus ou moins étendu, qui atteint souvent le volume d'une amande en vingt-quatre heures et aboutit parfois à la nécrose de la peau.

Expérience I. — Deux lapins reçoivent dans la peau épilée de l'abdomen un mélange de 0 c. c. 3 de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000 et de 0 c. c. 2 de culture de bactéridie diluée à 1 p. 1.000, soit 8 doses mortelles. *L'un résiste, l'autre meurt de charbon* en trois jours, dans les mêmes délais que les lapins témoins.

Deux autres lapins, qui avaient également reçu par voie dermique un mélange de 0 c. c. 5 de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000

(1) Nous exprimons tous nos remerciements à M. G. Ramon, sous-Directeur de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous fournir la toxine staphylococcique employée dans ces expériences.

et de 0 c. c. 2 de culture de bactéridie diluée à 1 p. 10, soit 800 doses mortelles, *sont morts de charbon en trois jours.*

Un lapin inoculé par voie sous-cutanée avec le même mélange a eu le même sort.

B. — Bactéridies mélangées avec des microbes vivants (*Staphylocoque, B. coli*).

Expérience II. — On inocule à 2 lapins, par voie dermique, un mélange de 0 c. c. 3 d'une suspension de culture sur gélose, âgée de vingt-quatre heures, de staphylocoque toxigène (10 cent. cubes d'eau physiologique par tube de culture) et de 0 c. c. 1 de culture de bactéridie à 1 p. 10, soit 400 doses mortelles. *Les deux animaux résistent.*

La même expérience est répétée sur deux autres lapins, avec un mélange de 0 c. c. 1 d'une suspension de culture sur gélose âgée de vingt-quatre heures, de *B. coli* toxigène (10 cent. cubes d'eau physiologique par tube de culture) et de 0 c. c. 1 de culture de bactéridie diluée à 1 p. 10. *Les deux animaux résistent.*

C. — Bactéridies mélangées avec des microbes pathogènes tués (*B. coli*).

Expérience III. — Deux lapins auxquels on avait inoculé par voie dermique un mélange de 8 doses mortelles de bactéridies et de 0 c. c. 3 de culture en bouillon Martin de *B. coli* âgée de six jours et stérilisée par chauffage à 58° pendant une heure, *n'ont pas contracté le charbon.*

Tous les lapins neufs qui, dans ces trois séries d'expériences, reçurent de une à quatre doses mortelles de bactéridies dans la peau, sont morts de charbon en deux ou trois jours. Ceux qui furent inoculés en un point de la peau *situé en dehors des foyers inflammatoires* ont également contracté le charbon et ont succombé dans les mêmes délais que les lapins témoins.

Sans doute, chez les lapins préparés avec la toxine staphylococcique, celle-ci s'est montrée peu efficace à faible dose, quant aux effets protecteurs de l'inflammation qu'elle produit dans le tégument, mais, le staphylocoque vivant et le *B. coli* vivant ou mort, ont inhibé complètement le développement de la bactéridie charbonneuse dans le tissu le plus réceptif de l'économie, même lorsque ce germe, d'une virulence très

élevée, était inoculé à des doses capables de tuer plusieurs centaines de lapins. Les résultats que nous avons ainsi obtenus confirment les observations anciennes de Pawlowsky, de Silberschmidt et Schoch, Gundel et Khewe ; en outre, ils apportent des précisions nouvelles sur la valeur de la résistance que la réaction dermique, engendrée par le *B. coli* et le staphylocoque, oppose à la végétation de la bactéridie au même point.

II. — Injections successives, au même point, de substances irritantes ou de germes microbiens tués, puis de bactéridies.

Expérience IV. — Huit lapins reçoivent *dans la peau* de l'abdomen 0 c. c. 5 d'une dilution à 1 p. 5 de *tuberculine brute*. Le lendemain, on leur inocule, exactement au même point, 20 doses mortelles de bactéridies. *Cinq résistent et un meurt de charbon* en trois jours dans les mêmes délais que les témoins.

Deux lapins, éprouvés comme les précédents par inoculation, dans un foyer inflammatoire de 10 doses mortelles de bactéridies, 2 autres éprouvés de même avec 30 doses mortelles, 4 lapins éprouvés avec 160 doses mortelles et 4 lapins éprouvés avec 400 doses mortelles ont également *échappé à l'infection charbonneuse*.

Quatre autres lapins, qui avaient reçu *dans la peau* 0 c. c. 5 de tuberculine brute diluée à 1 p. 5, ont été éprouvés par inoculation, au même point, de 20 doses mortelles de bactéridies : 2 *quarante-huit heures plus tard* et 2 *soixante-douze heures plus tard. Les 2 premiers ont résisté ;* 1 *lapin du deuxième lot est mort de charbon.*

Expérience V. — A. On injecte dans le derme de 4 lapins 1 cent. cube *de toxine staphylococcique* diluée à 1 p. 1.000 et, le lendemain, au même point 0 c. c. 2 de culture en bouillon de bactéridie, soit 8.000 doses mortelles. *Trois résistent et un meurt de charbon* en cinq jours.

B. Quatre lapins reçoivent en des points différents de la région abdominale, 5 injections intradermiques de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000. Le lendemain on inocule, dans chaque foyer inflammatoire, 0 c. c. 2 d'une culture de bactéridie en bouillon, âgée de vingt-quatre heures. Chaque lapin reçoit ainsi, au total, *1 cent. cube de culture virulente*, soit *40.000 doses mortelles. L'un d'eux est mort de charbon sept jours après cette épreuve massive.* Au contraire des animaux témoins infectés par voie dermique, il ne présentait aucune trace de l'œdème caractéristique habituel dans la région inoculée, mais sa rate contenait de nombreuses bactéridies encapsulées. *Les trois autres lapins ont résisté.*

EXPÉRIENCE VI. — La préparation de la peau est effectuée au moyen d'une injection intradermique de 0 c. c. 3 de culture de *B. coli tué.* Deux lapins ainsi préparés reçoivent le lendemain, au même point, 20 doses mortelles de bactéridies. *Ils résistent.*

EXPÉRIENCE VII. — La préparation de la peau est effectuée au moyen d'une injection intradermique de 1 cent. cube de *bouillon ordinaire.* Les deux lapins ainsi préparés ont reçu le lendemain, au même point, 400 doses mortelles de bactéridies. *Ils n'ont pas contracté le charbon.*

EXPÉRIENCE VIII. — Même expérience en remplaçant le bouillon par 0 c. c. 5 *d'eau salée à 3 p. 100.* Epreuve le lendemain au même point (8 doses mortelles). *Les deux lapins ainsi préparés ont résisté.*

EXPÉRIENCE IX. — Même expérience avec de *l'aleurone* (0 c. c. 5 d'une suspension à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique). Même épreuve. *Les deux lapins ont résisté.*

EXPÉRIENCE X. — Même expérience avec 1 cent. cube *d'une solution de gélose à 2 p. 1.000 dans l'eau distillée* (titre de la dilution employée par G. Ramon et A. Staub pour la dilution de leur vaccin charbonneux). Les 4 lapins ainsi préparés ont reçu le lendemain, au même point, 8 000 doses mortelles de bactéridies. *Aucun n'a contracté le charbon.*

EXPÉRIENCE XI. — Même expérience avec 1 cent. cube de la même *solution à 2 p. 1.000 dans l'eau physiologique.* Même épreuve. *Trois lapins ont résisté. Un est mort de charbon.*

EXPÉRIENCE XII. — Même expérience avec 1 cent. cube d'une *solution d'alun de potasse à 3 p. 100* (également employée par G. Ramon et A. Staub pour la dilution du vaccin charbonneux). *Trois lapins ont résisté* à l'inoculation faite le lendemain, au même point, de 8.000 doses mortelles de bactéridies. *Un est mort de charbon.*

EXPÉRIENCE XIII. — On injecte dans le derme de 2 lapins 1 cent. cube de *solution de chlorhydrate d'histamine à 1 p. 1 000.* Une grosse papule gorgée de liquide se développe en quelques instants. Au bout de vingt minutes on injecte dans cette papule même, 4 doses mortelles de bactéridies. Les deux animaux sont morts de charbon en moins de soixante-douze heures. Deux autres lapins préparés et éprouvés comme les précédents, mais chez lesquels l'injection d'histamine fut renouvelée au même point, une heure et six heures après l'inoculation de bactéridies, sont morts également de charbon.

Deux lapins préparés par une injection intradermique de *solution d'adrénaline à 1 p. 1.000* et éprouvés par inoculation au même point, vingt minutes après, de 4 doses mortelles de bactéridies, ont contracté le charbon.

EXPÉRIENCE XIV. — La préparation des animaux est faite la veille au moyen d'une inoculation de 1 cent. cube d'une *culture en bouillon d'une souche de bactéridie fortement œdématogène* mais non capsu-

logène et peu virulente pour le lapin, isolée par l'un de nous (N. Stamatin) de la souche virulente employée dans ces expériences.

Les deux lapins ainsi préparés ont reçu le lendemain dans la peau œdématiée, 800 doses mortelles de bactéridies virulentes. *Ils ont résisté.*

Expérience XV. — Deux lapins reçoivent *sous la peau* de l'abdomen 1 cent. cube de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000 et, le lendemain, au même point, également sous la peau, 8.000 doses mortelles de bactéridies. *Aucun ne contracte le charbon.*

Deux autres lapins, éprouvés de même vingt-quatre heures après une injection sous-cutanée de 0 c. c. 5 de culture tuée de *B. coli*, sont restés indemnes.

Tous les lapins témoins qui avaient reçu sous la peau 0 c. c. 0001 de culture de bactéridie, soit 4 doses mortelles par voie dermique, sont morts charbonneux en deux ou trois jours.

Même s'il existe quelques différences dans le degré de la protection conférée par la réaction cutanée ou sous-cutanée engendrée par ces différentes substances ou par des germes microbiens, et si l'on tient compte, pour les animaux, de certaines particularités individuelles, susceptibles de modifier l'intensité de cette réaction, d'autre part de la quasi-impossibilité d'opérer dans tous les cas dans des conditions rigoureusement identiques soit pour l'injection préparante, soit pour l'injection virulente d'épreuve, on peut conclure de cette série d'essais que l'inoculation de doses quelconques de bactéridies virulentes reste sans effet quand elle est effectuée dans un foyer inflammatoire récent.

Cette résistance tissulaire locale, conférée par l'injection intradermique de tuberculine, par exemple, s'affaiblit rapidement. Quand l'épreuve virulente est faite avec 20 doses mortelles de bactéridies trois jours après l'injection intradermique préparante, 1 lapin sur 2 contracte le charbon.

III. — Inoculation intradermique de bactéridies suivie d'une inoculation de germes étrangers vivants au même point.

Expérience XVI. — Deux lapins reçoivent dans le derme 4 doses mortelles de bactéridies et, *une heure après*, au même point, 0 c. c. 5 d'une suspension de staphylocoques toxigènes vivants (10 cent. cubes d'eau physiologique pour une culture sur gélose âgée de vingt-quatre heures). *Les deux animaux résistent.*

Sept autres lapins infectés dans les mêmes conditions et inoculés également au même point, avec une suspension de staphylocoques, *six heures plus tard, ont également résisté.* Mais 2 lapins réinoculés avec la même suspension de staphylocoques *vingt-quatre heures après* l'inoculation de 4 doses mortelles de bactéridies, *sont morts de charbon*, l'un en soixante-seize heures, l'autre en quatre-vingt-quatre heures.

Des faits analogues, montrant que le développement de l'infection charbonneuse peut être arrêté même lorsqu'on n'intervient que plusieurs heures après l'inoculation de bactéridies virulentes, avaient déjà été constatés par Emmerich (1886) pour le streptocoque de l'érysipèle ; par Woodhead et Wood (1889), Delarbre (1905) et Fortineau (1910) pour le bacille pyocyanique et sa toxine ; par Gundel et Khewe pour le *B. coli* (1932) et récemment par A. Besredka pour le streptocoque à l'égard du deuxième vaccin charbonneux. Ils témoignent à la fois du déséquilibre végétatif que subissent les bactéridies pendant les premières heures de leur séjour dans le tissu inoculé, et de la rapidité avec laquelle s'installe autour d'elles et intervient la réaction protectrice. Nous verrons plus loin que la courte trêve de quelques heures ainsi accordée à ces germes virulents avant que leur développement soit inhibé par l'inflammation locale, suffit pour qu'ils mettent en œuvre des processus immunitaires durables, d'une réelle efficacité.

IV. — Réceptivité du lapin et du cobaye aux bactéridies inoculées à travers un foyer inflammatoire.

S'il est difficile d'accepter sans réserve l'opinion de A. Besredka selon laquelle « en dehors de la peau, la bactéridie se comporte comme un germe saprophyte », et que, si elle pénètre dans l'organisme du lapin et du cobaye sans contaminer la moindre blessure du tégument « elle est aussitôt phagocytée et digérée », on ne peut contester que le tissu conjonctif lâche et surtout la séreuse péritonéale opposent une résistance manifeste au développement du charbon. Le degré de cette résistance se traduit par ces faits que la dose minima mortelle est 4 ou 5 fois plus élevée pour l'infection

par voie sous-cutanée que pour l'infection par voie intradermique, et que nombre de cobayes peuvent tolérer sans dommage 0 c. c. 1 de deuxième vaccin charbonneux dans le péritoine quand on prend la précaution de pratiquer l'inoculation sans léser la peau.

La démonstration, fournie précédemment, que les bactéridies, inoculées même à dose massive dans un foyer inflammatoire datant de vingt-quatre heures, sont détruites sur place sans produire le moindre signe de charbon, nous donnait le moyen de résoudre au mieux le problème posé par Besredka, et qui consiste à « faire pénétrer le virus dans le tissu sous-cutané sans toucher à la peau » ou, du moins, sans toucher les régions saines et réceptives de la peau. Il suffisait pour cela de créer un foyer inflammatoire dans le tégument — donc une zone insensible au charbon — et, en la traversant en ce point, au moyen d'une fine aiguille, d'injecter dans le tissu conjonctif sous-cutané, dans une séreuse ou dans une veine, des quantités de bactéridies sûrement mortelles sans cette précaution.

Expérience XVII. — On injecte à 24 cobayes, dans la peau de la région abdominale, 1 cent. cube de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000.

Le lendemain, 8 d'entre eux reçoivent au même point 0 c. c. 2 d'une dilution à 1 p. 50.000 d'une culture de bactéridie en bouillon âgée de vingt-quatre heures. *7 résistent et 1 meurt de charbon.*

En même temps, on inocule la même dose de la même culture aux 16 autres cobayes en enfonçant l'aiguille à travers le foyer inflammatoire pour injecter le liquide à environ 5 centimètres de la piqûre, en évitant de léser la couche profonde du derme. *14 meurent et 2 résistent.*

Il est à noter que l'œdème charbonneux s'est développé dans tous les cas, non dans la région traversée par l'aiguille, mais au lieu même où avait été injecté le liquide virulent.

Sur *12 cobayes non préparés* qui avaient reçu sous la peau la même dose de bactéridies, *11 sont morts de charbon, 1 a résisté.*

Expérience XVIII. — Deux lapins sont préparés par une injection de 1 cent. cube de toxine staphylococcique à 1 p. 1.000 dans la peau de la face externe de l'oreille, près du bord externe. Le lendemain on leur injecte dans la veine auriculaire, à travers le foyer inflammatoire, 0 c. c. 01 d'une culture en bouillon de bactéridie, âgée de vingt-quatre heures, soit 400 doses mortelles par voie dermique. *Un meurt de charbon* en soixante-six heures, *l'autre résiste.*

Un lapin témoin, inoculé par voie veineuse à travers la peau saine, est mort charbonneux en soixante-six heures.

Expérience XIX. — Deux lapins sont préparés par une injection, dans la peau de l'abdomen, de 1 cent. cube de toxine staphylococcique à 1 p. 1.000. Le lendemain, on leur inocule dans la cavité péritonéale, à travers le foyer inflammatoire, 0 c. c. 01 de la même culture de bactéridie ; un lapin témoin reçoit la même inoculation intrapéritonéale à travers la peau saine. *Les deux animaux ainsi préparés résistent, le témoin meurt charbonneux en soixante-six heures.*

Expérience XX. — Sept lapins reçoivent dans la peau du flanc 1 cent. cube de toxine staphylococcique à 1 p. 1.000. Le lendemain on leur inocule, sous la peau, en traversant le foyer inflammatoire au moyen d'une longue aiguille, 1 cent. cube d'une dilution à 2 p. 1.000 (80 doses mortelles par voie dermique) de culture en bouillon de bactéridie âgée de vingt-quatre heures. *1 meurt de charbon en soixante-six heures, les 6 autres résistent.*

La même expérience a été répétée en portant la dose infectante à 1 cent. cube d'une dilution de la même culture de bactéridie à 1 p. 100 (5 lapins), soit 400 doses mortelles par voie dermique et à 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 10 (2 lapins), soit 4.000 doses mortelles par voie dermique. *Les animaux inoculés sous la peau à travers un foyer inflammatoire créé la veille ont résisté, sauf un du premier lot et un du second* qui sont morts de charbon en cinquante-quatre et soixante-douze heures. Tous les témoins, qui avaient reçu à travers la peau saine 1 cent. cube d'une dilution de la même culture à 1 p. 10.000 (2 lapins) ou 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 1.000 (1 lapin), ou 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 500 (6 lapins), sont morts de charbon en cinquante à soixante-douze heures, sauf un du dernier lot.

Sept lapins de ces deux expériences ayant ainsi reçu sous la peau, dix-sept ou vingt-trois jours auparavant, 80 doses mortelles (3 lapins), 400 doses mortelles (3 lapins), ou 4.000 doses mortelles de bactéridies (1 lapin), ont été éprouvés par l'inoculation intradermique de 4 doses mortelles des mêmes germes : *4 sont morts de charbon* en quatre-vingt-seize heures (3) et cent vingt heures (1) avec un retard de vingt-quatre ou quarante-huit heures sur les témoins.

Les 3 survivants ont reçu dix jours après 8 doses mortelles par voie dermique *Ils sont morts de charbon en quatre jours.*

Les expériences portant sur le cobaye sont donc défavorables à l'hypothèse de Besredka qui représente la peau comme le seul tissu réceptif au charbon. Celles qui ont été effectuées sur le lapin lui apportent, au contraire, une évidente confirmation en démontrant qu'il suffit de protéger la peau au moyen d'un foyer inflammatoire, créé la veille au lieu même de l'inoculation virulente, pour que l'infection échoue dans la grande majorité des cas, quelle que soit la voie adoptée pour l'épreuve réelle : sous-cutanée, péritonéale, veineuse.

Nous pensons que la réceptivité particulière et apparemment exclusive de la peau du lapin est liée non pas à l'existence de cellules spéciales, mais à la texture du tégument qui permet aux bactéridies inoculées de végéter et de s'encapsuler à l'abri de toute action nocive, puis de se multiplier et de triompher par le nombre des effets bactéricides que les humeurs normales risqueraient d'exercer sur elles, comme cela se produit quand les germes sont introduits directement dans le tissu conjonctif sous-cutané, le péritoine ou le sang.

V. — Inoculation de bactéridies en suspension dans une solution de saponine ou dans un foyer inflammatoire provoqué par une injection de saponine.

L'emploi de solutions saponinées comme excipient pour les vaccins anticharbonneux a été préconisé par M. Mazucchi en 1929, puis par C. Hruska en 1931. Ces vaccins sont constitués soit par des bactéridies filamenteuses et des spores de virulence normale, soit par des bactéridies un peu moins atténuées que le deuxième vaccin de Pasteur. Les germes, récoltés sur gélose, sont mis en suspension dans des solutions de saponine dont le titre fut graduellement abaissé de 20 p. 100 à 1 p. 100.

Injectées sous la peau du lapin, les solutions les plus concentrées de saponine provoquent en quelques heures une vive réaction inflammatoire œdémateuse, qui se condense rapidement et aboutit parfois à la production d'une eschare. Mazucchi supposait que les bactéridies inoculées avec ces solutions irritantes sont immobilisées dans la réaction locale, puis résorbées peu à peu. La lenteur de leur résorption devait leur permettre d'exercer au maximum leur action antigénique et d'engendrer une immunité très efficace sans le moindre risque de généralisation. Lorsque la réaction due à la saponine est trop forte et qu'elle évolue vers la nécrose ou l'abcédation, les bactéridies trouvent dans le tissu mortifié un milieu si propice à leur végétation et à leur encapsulation, qu'elles peuvent alors produire un charbon mortel.

Les animaux qui échappent à cette infection n'acquièrent

aucune immunité (1 lapin sur 14 d'après A. Staub). Au contraire, si, en abaissant le taux du glucoside à 5 et même à 2 et 1 p. 100, on diminue proportionnellement l'intensité de la réaction qu'il détermine dans le tissu conjonctif sous-cutané, on obtient régulièrement la production d'une solide résistance spécifique. Selon P. Homutov, le développement de cette immunité serait favorisé « non par l'inflammation œdémateuse post-vaccinale, mais par la présence de la saponine adsorbée à la surface des germes injectés. En raison de sa présence, les germes ne pullulent que progressivement, permettant ainsi à l'organisme de fabriquer les anticorps spécifiques ». Pour plus de sécurité, cet auteur recommande de n'utiliser pour la préparation des vaccins saponinés, que la souche du deuxième vaccin de Pasteur, dont le degré d'atténuation est fixe.

De notre côté, nous avons essayé de voir comment se comportent, chez le lapin, au point de vue de l'infection et, éventuellement, au point de vue de l'immunité, les cultures de bactéridies virulentes inoculées directement dans la peau en mélange avec une solution de saponine ou dans un foyer inflammatoire provoqué vingt-quatre heures auparavant par une injection intracutanée de la même solution.

Expérience XXI — A. Deux lapins reçoivent dans la peau de l'abdomen, 0 c. c. 2 d'un mélange en parties égales d'une solution de saponine à 4 p. 100 et d'une culture en bouillon de bactéridies virulentes âgée de vingt-quatre heures, soit 4 000 doses mortelles. *Les deux animaux ont résisté.*

B. Sur 4 autres lapins qui avaient reçu également dans la peau 0 c. c. 4 d'un mélange en parties égales de la même solution de saponine et de la même culture virulente, soit 8.000 doses mortelles, *2 ont résisté et 2 ont contracté le charbon.*

Expérience XXII. — A. Deux lapins reçoivent *dans la peau* d'abord 0 c. c. 5 de solution de saponine à 2 p. 100, puis le lendemain, au même point, 8 000 doses mortelles de bactéridies virulentes dans 0 c. c. 2 de bouillon. *Les deux animaux ont résisté.*

B. Deux autres lapins auxquels on avait injecté *sous la peau* d'abord 0 c. c. 5 de solution de saponine à 2 p. 100 et le lendemain *sous la peau*, et au même point, 8.000 doses mortelles de bactéridies *ont également échappé au charbon.*

Dans la suite, treize jours plus tard, les 6 animaux de l'expérience XXI A et ceux de l'expérience XXII A et B ont été éprouvés par inoculation intradermique de 4 doses mortelles de culture en bouillon de bactéridies.

Les 2 lapins de l'expérience XXI A, qui avaient reçu 4.000 doses mortelles de bactéridies en suspension dans une solution de saponine *ont résisté.*

Les 2 lapins de l'expérience XXII A, qui avaient résisté à l'inoculation de 8.000 doses mortelles de bactéridies dans un foyer inflammatoire de la peau *sont morts de charbon,* l'un en quatre-vingt-dix-neuf heures, l'autre en quatre-vingt-quatre heures, soit vingt-quatre ou trente-six heures seulement après les témoins.

Des 2 lapins de l'expérience XXII B, qui avaient résisté à la même inoculation faite par voie *sous-cutanée, 1 a résisté, l'autre est mort de charbon en quatre-vingt-quatre heures.*

Douze jours après cette épreuve, les lapins survivants reçurent par voie dermique, 8 doses mortelles de la même culture virulente. *Tous sont morts de charbon* à peu près dans les mêmes délais que les lapins témoins.

Ainsi la vive réaction que la solution de saponine à 2 p. 100 provoque dans le derme ou le tissu conjonctif du lapin a pour effet d'empêcher le développement des bactéridies inoculées dans la région enflammée. A ce point de vue, la saponine agit comme les solutions irritantes et les suspensions microbiennes que nous avons étudiées au début de ce travail.

La destruction silencieuse, sur place, d'un grand nombre de germes virulents ne s'accompagne que d'une immunité médiocre, la moitié des lapins tolèrent alors 4 doses mortelles de bactéridies par voie dermique, mais ils succombent au charbon quand on double cette dose.

VI. — L'infection inhibée par une réaction inflammatoire engendre-t-elle l'immunité ?

Les exemples suivants font encore mieux apparaître que. chez les lapins qui ont reçu des doses variables, parfois très importantes, de bactéridies virulentes dans un foyer inflammatoire de la peau *datant de vingt-quatre ou quarante-huit heures,* on ne constate ultérieurement qu'une immunité très faible ou même aucune immunité contre le charbon (tableau I).

TABLEAU I.

NATURE DE LA SUBSTANCE injectée	NOMBRE de doses mortelles inoculées dans le foyer	INTERVALLE entre l'inoculation et l'épreuve en jours	NOMBRE de doses mortelles (épreuve dermique)	RÉSULTATS
Tuberculine à 1 p. 5	20	17	20	Mort en 40 heures.
	20	17	20	Mort en 40 heures.
	20	17	20	Mort en 72 heures.
	400	17	8	Mort en 66 heures.
	400	17	4	Mort en 36 heures.
Toxine staphyl. à 1 p. 1.000. .	40.000	10	4	Mort en 6 jours.
	40.000	10	4	Résiste (1).
	40.000	10	4	Résiste (1).
	8.000	17	8	Mort en 78 heures.
	8.000	17	4	Mort en 36 heures.
	8.000	17	4	Résiste (2).
B. coli tué	20 Puis 400	17	8	Mort en 84 heures.
	20 Puis 400	17	4	Mort en 36 heures.
Bouillon	400	17	4	Mort en 84 heures.
Gélose à 2 p. 1.000	8.000	12	4	Mort en 48 heures.
	8.000	12	4	Mort en 66 heures.
	8.000	12	4	Mort en 48 heures.
	8.000	12	4	Résiste.
	8.000	12	4	Mort en 66 heures.
	8.000	12	4	Mort en 84 heures.
	8.000	12	4	Résiste.
Alun à 3 p. 100.	8.000	12	4	Mort en 120 heures.

(1) Ces deux lapins ont été réinoculés dans la suite, de dix en dix jours avec 8, 40 et enfin 400 doses mortelles; l'un est mort après la dernière inoculation, l'autre a résisté.
(2) Éprouvé 15 jours plus tard par inoculation intradermique de 8 doses mortelles de bactéridies, meurt de charbon.

Quand les bactéridies sont inoculées *dans le derme, en mélange avec la substance inflammatoire*, les modifications immunitaires qui font suite à la destruction sur place des germes virulents sont beaucoup plus importantes et se traduisent ultérieurement par une résistance plus énergique aux réinfections (tableau II). De récents travaux de G. Ramon et A. Staub ont d'ailleurs montré que l'inoculation *sous-cutanée* de spores charbonneuses atténuées, en suspension dans une solution d'alun à 1 ou 3 p. 100 et de gélose à 2 p. 1.000, con-

TABLEAU II.

NATURE de la substance injectée	NOMBRE de doses mortelles inoculées dans le foyer	INTERVALLE entre l'inoculation et l'épreuve en jours	NOMBRE de doses mortelles (épreuve dermique)	RÉSULTATS
Staphylocoques vivants.	400	14	1	Résiste puis meurt d'infection intercurrente
	400	14	4	Résiste (1).
B. coli vivant	400	14	4	Mort en 78 heures.
B. coli tué	8	14	4	Résiste (2).
	8	14	8	Mort en 66 heures.

(1) Réinoculé 7 jours après avec 8 doses mortelles, résiste. Réinoculé 13 jours après avec 40 doses mortelles, meurt de charbon.
(2) Réinoculé 18 jours après avec 8 doses mortelles, meurt de charbon. Tous les témoins inoculés avec les mêmes doses de bactéridies par voie dermique sont morts en 72 heures.

fèrent au lapin et au mouton une immunité nettement supérieure à celle qu'engendrent les suspensions des mêmes germes en eau physiologique. L'application de ce procédé à la vaccination du bétail donne les meilleurs résultats dans la prophylaxie du charbon bactéridien.

Enfin, la valeur de l'immunité ainsi acquise croît encore lorsque la substance inflammatoire est injectée dans la peau, quatre ou six heures *après l'inoculation virulente*. Par exemple, 3 de nos lapins qui avaient résisté à l'inoculation intradermique de 4 doses mortelles grâce à l'injection faite six heures après, au même point, de 0 c. c. 5 d'une suspension de staphylocoques vivants, ont toléré, quinze jours plus tard, une inoculation intradermique de 4 doses mortelles de bactéridies. L'un est mort dans la suite d'une infection intercurrente, les deux autres ont reçu de dix en dix jours, dans la peau, d'abord 8 doses, puis 40, 400 et enfin 8.000 doses mortelles des mêmes germes. En dehors d'un léger œdème qui se développa quelques heures après l'inoculation, cette dernière épreuve massive est restée sans effet.

Il ressort de tous ces faits que la production de l'immunité anticharbonneuse est bien liée, comme le pensaient G. Ramon

et A. Staub, à l'imprégnation de l'organisme par des substances antigéniques issues des bactéridies et libérées dès les premières heures de leur séjour dans le derme ou le tissu conjonctif, à la faveur des réactions cellulaires qui surviennent autour d'elles. Si ces réactions sont trop précoces ou d'emblée trop intenses, la destruction des germes est trop rapide et trop complète pour mettre en jeu le mécanisme immunitaire. Si elles interviennent moins brutalement ou plus lentement, elles s'accompagnent alors d'une résistance assez efficace pour que les animaux supportent sans dommage l'inoculation d'une petite quantité de bactéridies très virulentes. L'immunité se développe dans toute son ampleur quand on adopte la voie sous-cutanée pour l'injection de bactéridies atténuées en suspension dans un liquide légèrement irritant, comme dans l'expérience de Ramon et Staub, ou quand on inocule les germes virulents quelques heures après la substance inflammatoire, comme dans les expériences de Blagovetschensky, de Besredka et celles que nous venons de résumer.

VII. — Sort des bactéridies inoculées dans un foyer inflammatoire.

Les constatations qui précèdent font nettement ressortir que les bactéridies inoculées dans un foyer inflammatoire sont, non seulement inhibées dans leur végétation, mais réellement détruites, puisque leurs effets pathogènes ne s'y manifestent plus, même après une période d'observation de plusieurs semaines. Il ne s'agit donc pas d'un simple obstacle que les réactions cellulaires et humorales opposeraient temporairement à la prolifération microbienne, mais d'une action bactéricide certaine dont nous allons essayer de déterminer le mécanisme.

Expérience XXIII. — On provoque la formation d'un foyer inflammatoire dans la peau de plusieurs lapins en leur injectant 0 c c. 5 de toxine staphylococcique diluée à 1 p 1.000 ; le lendemain on leur inocule au même point, 0 c c. 2 de culture en bouillon de bactéridies virulentes âgée de vingt-quatre heures, soit 1.000.000 de germes

environ. Puis, après des temps variés, on sacrifie ces animaux et on ensemence 10 cent. cubes de leur sang sur gélose en boîtes de Petri. On prélève aseptiquement un fragment de leur foie (2 ou 3 grammes), la rate entière et le fragment de peau inoculé, préalablement lavé à l'alcool et légèrement flambé ; on broie séparément tous ces prélèvements avec du sable stérile, on les met en suspension dans 3 ou 4 cent. cubes de bouillon et on les ensemence en totalité sur de la gélose coulée dans des boîtes de Petri, à raison de 2 boîtes par échantillon. Les résultats de ces ensemencements sont indiqués dans le tableau III.

TABLEAU III.

INTERVALLE entre l'inoculation et le prélèvement	NOMBRE DE COLONIES			
	Sang	Foie	Rate	Peau
30 minutes	0	0	0	∞
6 heures	0	0	0	∞
24 heures	0	0	0	25
48 heures	0	0	0	26
5 jours	0	0	0	55
8 jours				16
12 jours				8

∞, colonies incomptables.

Les cultures de sang, de rate et de foie, sont toujours restées négatives, ce qui indique que, réserves faites pour la migration éventuelle de quelques germes, dans les voies lymphatiques adjacentes, les bactéridies virulentes inoculées dans un foyer d'inflammation sont retenues et fixées au lieu même où elles ont été introduites, alors qu'en peau saine elles se disséminent dès les premières heures dans les ganglions lymphatiques du voisinage, puis dans la circulation sanguine.

Or, si l'ensemencement des foyers cutanés où s'abritent les bactéridies donne, jusqu'à la sixième heure après l'inoculation, une végétation très abondante, au contraire, les cultures faites à partir de la vingt-quatrième heure ne fournissent plus que de rares colonies dont le nombre ne subira que de faibles modifications jusqu'au douzième jour au minimum (2). Très rapidement, de la sixième à la vingt-quatrième heure, il se produit donc sur place une destruction brutale et massive qui ne laisse intacts que quelques germes.

(2) Il est facile de distinguer les colonies de bactéridies des quelques colonies de staphylocoques qui les accompagnent presque inévitablement.

Bien qu'elles soient incapables de tuer leur hôte même à longue échéance, les bactéridies qui persistent environ deux semaines au lieu de l'inoculation, sont encore assez vivaces pour engendrer un charbon mortel chez les lapins auxquels on injecte une suspension du tissu qui les contient. Il faut alors supposer qu'elles ne se montrent inoffensives pour le porteur que parce qu'elles sont non pas incluses dans le foyer, mais extérieures à la peau et disséminées dans les anfractuosités du système glandulaire ou du système pileux.

Mais, si une réaction inflammatoire banale de la peau est susceptible de produire ainsi, en quelques heures, la destruction d'un million de germes aussi virulents que la bactéridie charbonneuse employée et aussi résistants que les spores qui accompagnent les éléments filamenteux, la question se pose de savoir si, selon l'hypothèse générale de Metchnikoff, cette destruction a lieu dans les cellules phagocytaires qui envahissent la zone enflammée, ou si elle s'opère en dehors de ces cellules, sous l'influence des principes bactéricides contenus dans la lymphe exsudée.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons fait l'expérience que voici :

Expérience XXIV. — On inocule par voie dermique à plusieurs lapins, dans la même région, la même dose de bactéridies (0 c. c 2 d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures), aux uns dans la peau normale, aux autres dans un foyer inflammatoire créé la veille par une injection de 1 cent. cube de toxine staphylococcique diluée à 1 p. 1.000. Puis, après des délais variés, on ponctionne le tissu inoculé au moyen d'une pipette très effilée ; on étale sur lame la goutte de lymphe ainsi prélevée et on la colore au Giemsa ou au bleu de méthylène alcalin.

Dans la sérosité des animaux inoculés en peau saine, les bactéridies, aisément décelables, sont pour la plupart entourées d'une capsule ; au contraire, la sérosité des animaux inoculés dans un foyer inflammatoire ne contient aucun germe encapsulé. Il vient alors à l'esprit, en accord avec l'opinion courante, que, chez les premiers, les bactéridies protégées contre l'englobement phagocytaire par la capsule dont elles se sont enveloppées, vont continuer à proliférer librement pour pénétrer ensuite dans la lymphe efférente et

par l'intermédiaire du sang, se répandre dans tous les organes. Chez les seconds, les germes restés nus seraient exposés à devenir la proie des leucocytes et à être détruits sur place.

En vérité, l'encapsulation peut rendre la phagocytose inefficace, mais elle ne réussit pas à protéger la bactéridie contre l'action nocive du milieu ambiant. L'expérience nous a permis de constater, en effet, que si on inocule dans un foyer inflammatoire datant de la veille, des bactéridies encapsulées, provenant d'une culture âgée de vingt-quatre heures en sang citraté de lapin, ces germes, réputés non phagocytables, se comportent comme les germes nus dans les mêmes circonstances ; ils subissent les mêmes effets destructeurs, et l'infection qu'ils produisent si facilement et si rapidement en peau saine est presque toujours mise en échec (tableau IV).

TABLEAU IV.

DOSE DE TOXINE staphylococcique à 1 p. 1.000 injectée la veille (cent. cube)	INTENSITÉ de la réaction locale à la toxine	DOSE DE CULTURE de bactéridies encapsulées inoculée dans le foyer	RÉSULTATS
1	Forte.	0 c.c. 2 à 1 p. 1.000 (400 germes).	Résiste.
1	Forte	0 c.c. 2 à 1 p. 1.000 (400 germes)	Résiste.
1	Forte.	0 c.c. 2 à 1 p. 10 (40.000 germes).	Résiste
1	Presque nulle	0 c.c 2 à 1 p. 10 (40.000 germes).	Mort de charbon en 96 heures.
0 (témoin) . . .		0 c.c. 2 à 1 p. 1.000 (400 germes).	Mort de charbon en 72 heures.
0 (témoin)		0 c.c. 2 à 1 p. 10 (40.000 germes)	Mort de charbon en 96 heures.

Des faits analogues se produisent d'ailleurs chez les lapins solidement vaccinés au moyen de souches œdématogènes et atténuées de bactéridies, puis éprouvés par inoculation de quantités croissantes de bactéridies virulentes et finalement par inoculation intradermique d'une forte dose (0 c. c. 2) de ces germes.

Chez les animaux ainsi préparés, nous avons observé, *vers la sixième heure après la dernière épreuve, la formation*

d'un œdème, au lieu même de l'inoculation. Le plasma exsudé en ce point contenait un très grand nombre de leucocytes entre lesquels on distinguait des chaînettes de bactéridies bordées d'une mince capsule. Dans cette circonstance, comme dans la précédente, les bactéridies encapsulées ne sont pas englobées par les phagocytes ; elles restent libres, et cependant elles n'exercent pas leur activité pathogène habituelle : peu à peu elles disparaissent et l'infection d'épreuve avorte.

Action bactéricide du liquide d'œdème inflammatoire.

La découverte par Fodor (1887) des propriétés bactéricides du sang défibriné de lapin est une des plus anciennes acquisitions de l'immunologie. Les recherches dont elles ont été l'objet dans la suite sont à l'origine de nos connaissances sur l'alexine (Nuttall 1888, H Buchner 1889) ; elles devaient aboutir à la démonstration capitale de J. Bordet concernant la coopération de ce principe naturel et d'un principe humoral acquis, la sensibilisatrice, dans les phénomènes de l'hémolyse et de la bactériolyse par les sérums. Depuis, elles ont retenu l'attention d'un grand nombre de chercheurs et, récemment, G. Sanarelli et A. Alessandrini (1932) insistaient encore sur ce fait que la sérosité péritonéale du lapin entrave la germination des spores charbonneuses *in vitro* et qu'elle détruit graduellement *in vitro* et *in vivo* les bactéridies filamenteuses.

L'insuffisance de l'action phagocytaire des leucocytes que *nous avions constatée dans la destruction sur place des bactéridies inoculées au sein* d'un foyer *inflammatoire devait* nous *orienter, pour l'explication de ce phénomène, vers l'étude des propriétés bactéricides du liquide exsudé dans la zone tégumentaire irritée.*

En premier lieu, nous avons cherché à obtenir des quantités assez importantes d'une telle lymphe A cette fin, nous avons adopté la technique préconisée par A. Borrel pour la récolte de la lymphe claveleuse, et qu'une longue pratique nous a rendue familière à tous deux.

Nous avons donc injecté à des lapins, sous la peau de l'abdomen, de 10 à 30 cent. cubes de dilution à 1 p. 1.000 de toxine staphylococcique, répartie sur une surface aussi grande que possible. Le lendemain, tout le tissu conjonctif sous-cutané, enflammé par la toxine, est distendu par un œdème abondant. On sacrifie l'animal et, au niveau de la région œdématiée, on découpe un large volet dans la peau préalablement aseptisée ; on excise le tissu conjonctif gonflé de liquide clair, jaune citrin et on le recueille dans un verre conique, avec la lymphe prélevée au moyen d'une forte pipette stérile. On laisse ces produits pendant vingt-quatre heures à la glacière, puis on décante le liquide exsudé et on le répartit dans de petits tubes stériles, à raison de 0 c. c. 75 par tube. Immédiatement après cette répartition, on ajoute, sous le volume constant d'une goutte, à chacun des tubes, sauf un qui servira de contrôle de stérilité, une quantité déterminée de bactéridies provenant d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures. On agite soigneusement et on porte à l'étuve. Après des délais variés, cinq minutes, six heures, vingt-quatre heures, on ensemence séparément sur gélose, une goutte de chaque tube prélevée avec la même anse de platine. A la quarante-huitième heure, le contenu des tubes est ensemencé en totalité sur de la gélose coulée en boîtes de Petri.

Le nombre des colonies de bactéridies qui se développent à 37° sur ces milieux est compté le lendemain de l'ensemencement.

Les tableaux V et VI résument toute une série d'expériences comparatives, effectuées non seulement avec des liquides d'œdème tels quels ou centrifugés, ou chauffés pendant trente minutes à 56°, provenant de lapins différents ou

TABLEAU V.

NATURE DU PRODUIT LIQUIDE	NOMBRE de bactéridies ensemencées	NOMBRE DE COLONIES fournies par l'ensemencement des produits après un contact de			
		5 min.	6 h.	24 h.	48 h
Sang défibriné de lapin	800	+	6	∞	
	80	1	2	∞	
Sérum frais de lapin	800	6	0	0	0
	80	0	0	0	0
Liquide d'œdème de lapin A	800	0	0	0	0
	80	0	0	0	0
Liquide d'œdème de lapin B	3.000	0	0	0	
	300	0	0	0	
Même liquide B centrifugé	3.000	0	0	0	
	300	0	0	0	
Même liquide B chauffé	3.000	0	0	0	
	300	0	0	0	
Bouillon ordinaire	800	0	36	∞	
	80	0	2	∞	

TABLEAU VI.

NATURE DU PRODUIT ÉTUDIÉ	NOMBRE de bactéridies ensemencées	NOMBRE DE COLONIES fournies par l'ensemencement des produits après un contact de			
		5 min.	6 h.	24 h.	48 h.
Sérum frais de lapin	30.000	10	0	0	0
	300	1	0	0	0
Liquide d'œdème frais de lapin .	30.000	6	0	0	0
	300	1	0	0	0
Liquide d'œdème chauffé de lapin.	30.000	4	0	∞	∞
	300	1	0	0	0
Sérum frais de cobaye	30.000	50	∞	∞	
	300	4	11	∞	
Sérum chauffé de cobaye. . . .	30 000	23	∞	∞	
	300	0	400	∞	
Liquide d'œdème frais de cobaye.	30.000	26	12	∞	
	300	3	3	Infecté.	

de cobayes, mais encore avec le sang défibriné et le sérum de ces animaux.

Pour mieux apprécier la rapidité avec laquelle s'opère la destruction des bactéridies, nous avons ensemencé deux séries de 3 tubes contenant chacun 0 c. c. 75 de liquide d'œdème frais de lapin, l'une avec 4.000 bactéridies, l'autre avec 400 bactéridies provenant de la même culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures. Les mélanges ont été soigneusement agités et, après cinq minutes, trois heures, et sept heures, le contenu d'un tube de chaque série a été ensemencé en boîte de Petri. Les résultats des cultures ont été les suivants :

Pour la série des 4.000 germes :

Laissés en contact 5 minutes	3.200	colonies.
Laissés en contact 3 heures.	35	—
Laissés en contact 7 heures.	8	—

Pour la série des 400 germes :

Laissés en contact 5 minutes.	20	colonies.
Laissés en contact 3 heures	3	—
Laissés en contact 7 heures	0	—

La destruction des bactéridies par le liquide d'œdème de

lapin est aussi rapide quand il s'agit de germes encapsulés (tableau VII).

TABLEAU VII.

NOMBRE DE BACTÉRIDIES encapsulées ensemencées dans 0 c.c 75 de liquide d'œdème frais de lapin	NOMBRE DE COLONIES fournies par l'ensemencement de ce liquide après un contact de			
	5 minutes	6 heures	24 heures	48 heures
300.000 (1)	150	0	0	0
3.000 (1)	5	0	0	0
3.000 (2) . . .	0	0	0	0

(1) Les bactéridies ensemencées provenaient d'une culture agée de 24 heures en sérum de cobaye chauffé. Tous les germes étaient entourés d'une belle capsule.
(2) Les bactéridies provenaient d'un liquide d'œdème charbonneux de lapin ; elles étaient toutes encapsulées.

Toutes ces constatations faites les unes sur l'animal même, les autres *in vitro* concourent à démontrer que le sort des bactéridies inoculées dans un foyer inflammatoire, est réglé par les propriétés bactéricides de l'exsudat épanché en ce point.

Chez les lapins immuns, les manifestations prémonitoires de la résistance semblent consister, lors de l'inoculation virulente d'épreuve, dans le développement, au lieu de l'infection, *d'une réaction exsudative précoce qui s'apparente aux réactions accélérées de surinfection* obtenues chez les animaux atteints de maladies allergisantes *. De même que la réaction inflammatoire provoquée chez les animaux normaux par l'injection de substances irritantes, cette réaction a pour effet d'immobiliser les germes inoculés, de les localiser et de les préparer à subir au maximum l'action destructive des principes bactéricides normaux, renforcés par les anticorps acquis que contient le plasma épanché dans le foyer.

* Des réactions de type allergique ont déjà été signalées par E. Rivalier (*Thèse médecine*, Paris 1924, p. 145) et surtout par D. Combiesco (*C. R. Soc. de Biol.* 1929, **102**, p. 128) chez des cobayes préparés par des inoculations intradermiques de bactéridies atténuées.

VIII. — Immunité paraspécifique au charbon engendrée par la tuberculose.

Toshi Hirayama (1930) a fait cette constatation, confirmée et précisée par C. Ninni et T. de Sanctis Monaldi, que les cobayes tuberculeux ou vaccinés par le BCG depuis quatre semaines au minimum, sont nettement moins réceptifs que les cobayes neufs à l'infection bactéridienne.

Les lapins tuberculeux ou rendus allergiques par une inoculation de bacilles humains vivants, de BCG ou de bacilles morts, datant de six semaines au moins, manifestent également, selon nos propres observations, cette sorte de résistance paraspécifique. Mais, en général, cette résistance est assez médiocre et son efficacité ne dépasse guère celle qui accompagne l'infection escamotée par une réaction inflammatoire banale (tableau VIII). Le mécanisme dont elle procède est encore plus obscur ; on peut cependant supposer que l'obstacle apporté au développement des bactéridies dans le tégument des animaux préparés par une inoculation de bacilles tuberculeux résulte de la mise en jeu, au lieu même de l'épreuve, de réactions tissulaires, rendues assez intenses d'emblée du fait de l'hypersensibilité engendrée par le bacille tuberculeux.

Sous cet aspect, l'ébauche d'immunité que ces animaux acquièrent à l'égard du charbon serait liée à l'intervention de principes humoraux identiques à ceux qui opèrent dans les foyers inflammatoires. Bien que l'expérience nous ait montré que la désensibilisation préalable des cobayes tuberculeux par un traitement prolongé à la tuberculine ne diminue pas leur résistance au charbon, il nous paraît très vraisemblable d'admettre que cette résistance relève de l'allergie non spécifique conférée par le bacille de Koch (3).

(3) Au sujet de l'allergie non spécifique des cobayes tuberculeux, consulter les travaux de Paul Bordet (1936).

Tableau VIII. — **Résistance au charbon des lapins tuberculeux ou rendus allergiques par des injections de bacilles morts ou de bacilles atténués.**

NOMBRE de doses mortelles de bactéridies inoculées	DURÉE de l'infection charbonneuse en heures	DURÉE de la survie après la mort des témoins en heures	TYPES DES BACILLES INOCULÉS	ASPECT des lésions tuberculeuses
20	48	0	10 milligr. bacilles humains tués, par voie veineuse.	Aucune lésion.
20	96	+ 48	20 milligr. bacilles humains tués, par voie veineuse.	Id.
20	*Survit* (1)		Id.	Id.
40	96	+ 48	20 milligr bacilles bovins tués, par voie veineuse.	Id.
40	96	+ 48	Id.	Id.
40	96	+ 48	Id	Id
40	96	+ 48	Id.	Id.
8	72	+ 24	10 milligr. BCG par voie veineuse.	Id.
8	72	+ 24	Id.	Id.
8	48	0	Id.	Id.
20	*Survit.*		0 milligr. 1 bacilles humains vivants par voie veineuse.	Id.
20	84	+ 36	0 milligr. 1 bacilles humains virulents pour le lapin, même voie	Nombreux nodules pulmonaires.
8	36	— 12	Id	Id.
8	84	+ 36	Id.	Id.
8	84	+ 36	0 milligr. 01 mêmes bacilles, même voie.	Id.
8	72	+ 24	Id.	
8	72	+ 24	Id.	
8	72	+ 24	1 milligr. mêmes bacilles, voie sous-cutanée.	Aucune lésion.
8	72	+ 24	Id.	Id.
8	84	+ 36	0 milligr. 1 bacilles humains atténués (R 1) voie veineuse.	Id.
8	60	+ 12	Id.	Id
8	60	+ 12	Id.	Id.
8	84	+ 36	Id	Id.
8	36	0	1 milligr. bacilles humains atténués (R 1) voie veineuse.	Id.
8	96	48	Id.	Id.
8	72	24	10 milligr. bacilles humains atténués (R 1) voie veineuse.	Id.
4	*Survit.*		0 milligr. 01 bacilles bovins virulents voie veineuse.	Tuberculose généralisée.
8 . . .	80	42	Id.	Id.
8	72	24	Id.	Id.

(1) Réinfecté 23 jours plus tard avec la même dose de bactéridies, ce lapin est mort de charbon.

Sur 23 cobayes qui avaient reçu une dose mortelle de bactéridies, alors qu'ils étaient atteints de tuberculose très avancée, due à un bacille humain, 20 sont morts entre le troisième et le huitième jour avec, pour quelques-uns, un retard peu important sur les témoins ; 3 seulement ont survécu.

Enfin, 5 cobayes tuberculeux, éprouvés comme les précédents, mais à un stade beaucoup moins avancé, sont morts de charbon dans les mêmes délais que les témoins.

Résumé et conclusions.

Chez le lapin, l'inoculation de doses quelconques de bactéridies virulentes reste sans effet quand elle est effectuée dans une région enflammée de la peau. La résistance tissulaire ainsi conférée par la réaction inflammatoire est strictement locale. Très marquée dans les vingt-quatre ou quarante-huit premières heures, elle perd dès le troisième jour la plus grande partie de son efficacité.

Des réactions provoquées chez le lapin par l'injection intradermique de chlorhydrate d'histamine ou d'adrénaline n'ont eu aucun effet protecteur à l'égard du charbon inoculé vingt minutes plus tard au même point.

Le développement de l'infection charbonneuse peut être suspendu par une réaction inflammatoire même quand la substance irritante n'est injectée que plusieurs heures après les bactéridies, mais toujours au même point de la peau.

Si l'on protège la peau, en y créant un foyer d'inflammation à travers lequel on inocule des bactéridies le lendemain, soit dans le tissu conjonctif sous-cutané, soit dans la cavité péritonéale, soit dans la circulation sanguine, l'infection charbonneuse échoue presque toujours chez le lapin. Au contraire, chez le cobaye, l'effet protecteur du foyer est inconstant et faible.

La solution de saponine à 2 p. 100, employée comme vecteur de certains vaccins charbonneux, agit comme les autres substances irritantes. Lorsqu'on inocule des bactéridies en

un point de la peau soumis la veille à une injection de 0 c. c. 5 de cette solution, l'infection avorte. Mais cette destruction silencieuse de germes virulents ne s'accompagne que d'une immunité médiocre.

Lorsque les réactions cellulaires et humorales qui préparent et effectuent la destruction des bactéridies dans les foyers d'inflammation, sont trop précoces ou d'emblée trop intenses, il n'en résulte aucune immunité appréciable Quand elles interviennent moins brutalement ou plus lentement, elles s'accompagnent d'un faible degré de résistance spécifique. Mais l'immunité se développe dans toute son ampleur si l'on adopte la voie sous-cutanée pour inoculer les bactéridies en suspension dans un liquide faiblement irritant, comme dans la vaccination de G. Ramon et A. Staub, ou si on les inocule *quelques heures après* la substance inflammatoire, au même point.

L'ensemencement du foyer inflammatoire de la peau où les bactéridies ont été inoculées montre qu'elles sont détruites sur place presque en totalité entre la sixième et la vingt-quatrième heure. La phagocytose intervient peu dans cette destruction ; le liquide exsudé en ce point manifeste au contraire des propriétés bactéricides très élevées, qu'il s'agisse de bactéridies nues ou de bactéridies encapsulées.

C'est à l'action de ces principes bactéricides de la lymphe inflammatoire qu'il faut attribuer, croyons-nous, l'inhibition de l'infection charbonneuse quand les bactéridies inoculées sont associées à des substances irritantes, à des germes microbiens ou à leurs toxines

Les lapins immunisés contre le charbon répondent à l'inoculation intradermique de bactéridies virulentes par une réaction inflammatoire, précoce, qui semble avoir pour effet d'immobiliser les germes d'épreuve et de les préparer ainsi à subir au maximum l'action destructive des principes bactéricides normaux, renforcés par les anticorps acquis au cours de l'immunisation.

L'ébauche d'immunité que les lapins et les cobayes tuberculeux acquièrent à l'égard du charbon semble liée à l'intervention d'éléments cellulaires et de principes humoraux

identiques à ceux qui opèrent dans les foyers d'inflammation. Il est vraisemblable d'admettre qu'elle relève de l'allergie non spécifique conférée par le bacille de Koch.

BIBLIOGRAPHIE

BUCCO. *Cent. f. Allg. Path.*, **6**, 1895, p. 16.

BESREDKA (A.). Ces *Annales*, **35**, 1921, p. 421 ; *Bull. Inst. Pasteur*, **20**, 1922, p. 473 et 513 ; **23**, 1925, p. 872 ; Immunité locale, Paris, 1925.

BLAGOVESTSCHENSKY (N.). Ces *Annales*, **4**, 1890, p. 689.

BOQUET (A.) et SAENZ (A.). Ces *Annales*, **50**, 1933, p. 311.

BOQUET (A.), NINNI (C.) et BRETEY (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 311.

BORDET (J.). Ces *Annales*, **11**, 1897, p. 177.

BORDET (P.). Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 325 ; **57**, 1937, p. 357.

BOUCHARD (P.). *C. R. Acad. des Sc.*, **108**, 1889, p. 713.

BUCHNER (H.). *Berlin. klin. Woch.*, 1890, p. 216.

DELARBRE. *Thèse Médecine*, Paris, 1906.

DUNGERN (VON). *Zeit. f. Hyg.*, **18**, 1894, p. 177.

EMMERICH (R.). *Arch. f. Hyg.*, **6**, 1887, p. 442.

EMMERICH et LOW. *Zeit. f. Infekt.*, **31**, 1899, p. 1.

FORTINEAU (L.). Ces *Annales*, **24**, 1910, p. 955.

FRANCK (G.). *Munch. Med. Woch.*, n° 9, 1899.

FURST. *Arb. Gesundh.*, **52**, 1920, p. 93.

GRATIA (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **89**, 1923, p. 827.

GUNDEL (M.) et KHEMPF (H.). *Cent. f. Bakt.*, **124**, 1932, p. 519.

HIRAYAMA (T.). *Zeit. f. Immun.*, **68**, 1930, p. 218.

HOMPTON (P.). Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 535.

HRUSKA (C.). *C. R. Acad. des Sc.*, **192**, 1931, p. 882.

ISABOLINSKY (M. P.) et SOBOLEWA (R. M.). *Cent. f. Bakt.*, **133**, 1934, p. 107.

ISSAEFF. *Zeit. f. Hyg.*, **16**, 1894, p. 287.

JEZIC (J.). *Tierärtz. Runds.*, **15**, 1934.

DI MATTEI (C.). *Lav. di Istit. Igiene*, Rome, 1889.

MAZUCCHI. (M.). *Clin. Veter.*, 1929, p. 201 et 663.

METCHNIKOFF (E.). *Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, 1901.

NINNI (C.) et DE SANCTIS MONALDI (T.). *C. R. Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 1246.

PAPACOSTAS (G.) et GATÉ (J.). *Les Associations microbiennes*, Paris, 1928.

PASTEUR (L.). *C. R. Acad. des Sc.*, **85**, 1877, p. 107 ; **91**, 1880, p. 315.

PAWLOWSKY. *Virch. Arch.*, **108**, 1887, p. 494.

RAMON (G.) et FALCHETTI (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1077.

RAMON (G.) et STAUB (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1073 ; *C. R. Acad. des Sc.*, **201**, 1935, p 241 ; **203**, 1936, p. 132 ; *Bull. Acad. Vétér. de France*, **9**, 1934, p. 375 ; *Rev. Immun.*, **2**, 1936, p. 401.

ROGER (G. H.). *C. R. Soc. de Biol.* **47**, 1895, p. 375.

SANARELLI (G.) et ALLESSANDRINI. *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 849.

SILBERSCHMIDT (W.) et SCHOCH (E.). Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 669.

STAMATIN (N.). *Arch. Veter.*, **26**, 1934, p. 1; Ces *Annales*, **61**, 1938, p. 394.

STAUB (A.). *C. R. Soc. de Biol.* **110**, 1932, p. 1214.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES HÉMORRAGIQUES

par A. ALECHINSKY.

(Laboratoire de Bactériologie de l'Université de Bruxelles.)

On sait, depuis longtemps, que de nombreuses infections se compliquent fréquemment d'effusions sanguines, mais, jusqu'à ces dernières années, le phénomène n'avait suscité que des essais d'interprétation fragmentaires et imprécis.

C'est pourquoi les travaux récents de Shwartzman ont été accueillis avec tant d'intérêt, car ils révélaient, avec une constance parfaite, les conditions expérimentales de production d'un phénomène de réactivité cutanée à caractère hémorragique obtenu à l'aide de produits bacillaires.

Mais si Shwartzman s'est attaché aux modalités cutanées de ces réactions, il se fait que Sanarelli, bien avant lui, en avait décrit les manifestations viscérales, qui, comme nous le verrons, procèdent d'un mécanisme identique.

La toute première observation faite par Sanarelli remonte à 1894 [1]. Il poursuivait alors des recherches sur les propriétés de la toxine typhique. Il avait constaté qu'une première injection de cette toxine détermine, chez le singe, des troubles de toxi-infection, dont l'animal se rétablissait rapidement. Deux jours après, une deuxième injection du même produit entraînait la mort, précédée d'une éruption purpurique très étendue.

Ni à ce moment, ni du reste plus tard, Sanarelli n'a pu mesurer toute la portée de ces observations. Il a continué ses longues et patientes études sur les toxines produites par les microbes de la flore intestinale et on retrouve, éparses dans les nombreux travaux qu'il publia depuis 1916 [2], des observations d'expérience qui, à la lueur de nos connaissances actuelles, apparaissent chaque fois comme des cas particuliers

de « phénomènes hémorragiques » cutanés ou viscéraux. Ce n'est qu'en 1924 [3] que Sanarelli a lui-même dégagé de toutes ses propres observations une description précise et nette des conditions d'obtention d'hémorragies viscérales, résultant d'une deuxième injection d'un produit bacillaire, chez un organisme ayant déjà subi une première injection.

Le phénomène de Sanarelli.

Si, dans la veine marginale de l'oreille du lapin, on introduit un peu de culture en bouillon de vibrion cholérique, l'inoculation est bien supportée, l'animal ne présente aucun malaise apparent. Mais si, vingt-quatre heures après l'injection du choléra, on injecte par la même voie du filtrat de culture en bouillon d'un microbe banal, colibacille ou *Proteus*, on voit apparaître bientôt des symptômes d'algidité et, en quelques heures, l'animal succombe.

A l'autopsie, on constate que la cavité abdominale renferme des caillots de sang ; les viscères sont congestionnés ; certains de ces viscères présentent des taches hémorragiques de dimensions fort variables, allant de points purpuriques jusqu'à de larges ecchymoses, notamment dans l'intestin, sur les parois épiploïques et dans les reins.

Sanarelli signala aussi que les mêmes symptômes d'algidité avec hémorragie se répètent même quand le vibrion, au lieu d'être injecté dans la veine, est inoculé directement dans des tissus lymphoïdes tels que l'appendice, ou les plaques de Peyer du cæcum, vingt-quatre heures avant l'injection intraveineuse du filtrat. Dans ce cas, les réactions congestives et hémorragiques sont particulièrement prononcées aux endroits où fut pratiquée l'inoculation du choléra.

Les expériences de Sanarelli furent reprises dès 1923, par Zdrodovski et Brenn qui, en 1925 [4], confirment entièrement ces résultats. Ils soulignent que les hémorragies sont constantes et fréquemment généralisées, s'étendant à un grand nombre de viscères, parfois même à la peau. En 1928 [5], lors d'une deuxième publication sur le même sujet, Zdrodovski proposa de donner à l'ensemble de ces symptômes pathognomoniques, l'appellation de « Phénomène de Sanarelli ».

Le phénomène de Shwartzman.

C'est en étudiant la réactivité cutanée avec la toxine typhique que Shwartzman découvrit, en 1927 [6], le phénomène que voici :

Lorsque dans la peau du lapin on injecte quelques centicubes du filtrat d'une culture en bouillon de bacille typhique, il ne se forme à l'endroit de l'injection qu'une simple réaction inflammatoire banale avec œdème sans importance. Mais si, vingt-quatre heures après, on introduit un peu de ce filtrat par voie intraveineuse, on voit apparaître, en quelques heures, une tache hémorragique à la peau, là où fut pratiquée la première injection.

En 1928 [7], et dans les années suivantes, Shwartzman constata que d'autres filtrats tels que les filtrats de cultures de *B. coli*, de méningocoque, de bacilles dysentériques, de bacilles paratyphiques, etc., peuvent être utilisés pour la première ou la seconde injection. De plus, la première ne doit pas nécessairement être administrée sous la peau : pratiquée dans le poumon ou dans le rein, elle détermine la localisation de la lésion hémorragique, qui sera provoquée vingt-quatre heures plus tard par l'introduction intraveineuse du filtrat microbien.

Au début, ce phénomène, comme d'ailleurs celui qu'avait observé Sanarelli, n'a retenu que peu l'attention des chercheurs. L'élan ne fut vraiment donné qu'en 1930, au premier Congrès International de Microbiologie, lorsque Shwartzman lui-même eut communiqué à cette assemblée les résultats de ses recherches. Et, presque simultanément, parurent en 1931 les premières publications de F. Burnet [8], de Gratia et Linz [9], de Paul Bordet [10]. Puis, de tous côtés, d'autres travaux ont vu le jour, apportant de larges contributions à l'étude de ces phénomènes.

C'est ainsi que F. Burnet, tout en confirmant les expériences de Shwartzman, apporta des faits intéressants sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir au cours de ce travail. Gratia et Linz, d'une part, Paul Bordet, d'autre part, outre la confirmation des travaux de Shwartzman et de Sanarelli, eurent le

grand mérite de reconnaître l'analogie existant entre les phénomènes observés par Sanarelli et par Shwartzman. Ces auteurs ont montré, en effet, que divers agents infectieux — c'est notamment le cas pour le charbon, la vaccine et la rage (Gratia et Linz) [**11**, **12**, **13**], la tuberculose, la pseudo-tuberculose et le muguet (Paul Bordet) [**14**, **15**, **16**], — sont capables, comme les filtrats microbiens, de jouer le rôle d'éléments préparants. Leur localisation fixe le siège de la lésion hémorragique et en fait soit un Sanarelli, soit un Shwartzman, suivant la technique employée à leur production.

La grande analogie des réactions hémorragiques obtenues dans les deux cas devait forcément amener les chercheurs à la question suivante :

LE PHÉNOMÈNE DE SANARELLI ET LE PHÉNOMÈNE DE SHWARTZMAN SONT-ILS IDENTIQUES ?

En partant de l'analogie frappante des réactions, Gratia et Linz n'ont pas hésité à admettre leur identité. Paul Bordet considère que la réaction de Shwartzman n'est qu'une variante de la réaction de Sanarelli. Il y a là un problème qui demande une solution définitive. Et, avant d'entrer dans le vif de la discussion, il nous paraît utile de comparer les conditions respectives nécessaires à la réalisation de ces deux phénomènes.

Pour les comparer, faisons d'abord ressortir les analogies ; elles sont nombreuses.

1° Dans le phénomène de Sanarelli, comme dans les phénomènes de Shwartzman, nous avons vu que la première injection, dite préparante, peut être pratiquée à l'aide d'une culture ou à l'aide des filtrats de cultures, de germes divers.

2° Pour la seconde injection, dite déchaînante, on peut utiliser soit un filtrat de la même culture que celle qui a servi pour la préparante, soit un filtrat provenant d'un germe différent.

3° L'incubation, c'est-à-dire l'intervalle de temps qu'on laisse s'écouler entre les injections, est généralement de douze à quarante-huit heures dans les deux cas.

4° Les animaux les mieux adaptés à ces expériences sont les lapins et les cobayes, mais l'animal de choix reste toujours, pour les deux phénomènes, le lapin.

5° Enfin, les symptômes fondamentaux qui caractérisent le phénomène de Sanarelli et le phénomène de Shwartzmann, sont les hémorragies.

Voyons maintenant en quoi consistent les différences ; elles sont moins nombreuses.

1° Dans le phénomène de Shwartzman, on sait que l'injection préparante est effectuée par la voie dermique ; dans le phénomène de Sanarelli , elle est administrée par la voie veineuse.

2° Tandis que dans le phénomène de Shwartzman les manifestations hémorragiques apparaissent à l'endroit de l'injection préparante, dans le phénomène de Sanarelli elles sont généralement multiples et disséminées dans plusieurs organes.

Tels sont, en résumé, les principaux faits indiquant l'étroite parenté de ces phénomènes. Les différences qui les séparent, on le conçoit aisément, sont en réalité d'ordre purement technique. On peut donc s'attendre à ce qu'en modifiant la technique de préparation de Shwartzman, nous assistions à l'apparition d'un phénomène complet de Sanarelli-Shwartzman, et l'expérience a confirmé notre hypothèse.

Obtention du phénomène complet, cutané et viscéral.

On sait que Shwartzman attribuait primitivement une importance considérable à ce qu'il appelle « le facteur peau ». L'intervention active du tissu cutané lui semble être indispensable au développement des réactions hémorragiques. Lui-même, cependant, avait noté la possibilité de préparer un rein ou un poumon. Sanarelli avait montré également la possibilité de préparer les organes lymphoïdes.

Notre premier soin a donc été de rechercher une technique expérimentale permettant de provoquer l'hémorragie non pas par l'injection préparante dermique locale, comme l'a fait Shwartzman, ou par l'injection préparante vasculaire générale, comme l'a fait Sanarelli, mais par l'introduction du

filtrat préparant directement dans le réseau vasculaire d'un territoire bien délimité.

La technique employée est très simple.

A l'aide de deux petits bâtonnets en bois, dont nous lions les extrémités, nous comprimons la base de l'oreille d'un lapin, de façon à arrêter toute circulation dans la partie distale de cette oreille. Dans l'oreille ainsi traitée, nous introduisons par la veine marginale, 0 c. c. 5 du filtrat d'une culture de *B. coli* en bouillon de six jours : c'est l'injection préparante. On voit par transparence, le filtrat parcourir le système veineux de tout le territoire isolé. Après quatre ou six heures, la compression est levée, la circulation se rétablit et l'oreille se redresse rapidement comme si rien ne s'était passé. Si à ce moment, ou dans les vingt-quatre heures qui suivent, on injecte 2 ou 3 cent. cubes du même filtrat dans la veine marginale de l'oreille du côté opposé, il se développe en quelques heures des points purpuriques de plus en plus nombreux, qui se confondent finalement, pour former une nappe hémorragique parfois considérable, couvrant toute la surface de l'oreille préparée (fig. 1, 2, 3, 4, 5).

Cette expérience effectuée chez une quarantaine de lapins, nous a donné des résultats absolument semblables dans 75 p. 100 des cas ; 25 p. 100 n'ont réagi que d'une façon douteuse ou faiblement. Chez ceux-ci, une deuxième injection par la voie intraveineuse pratiquée vingt-quatre heures après la première, provoque régulièrement la mort du lapin, au bout de deux à six heures, rarement après vingt-quatre heures. L'autopsie décèle alors des réactions hémorragiques viscérales du type Sanarelli. Elles siègent habituellement dans les poumons, les reins, dans l'intestin, et parfois même dans le foie ou dans les capsules surrénales. Elles sont la preuve que les lésions vasculaires ne sont pas localisées seulement à la partie périphérique, c'est-à-dire aux capillaires de la peau, mais que la circulation viscérale, elle aussi, a été influencée par la première injection déchaînante, puisqu'une nouvelle injection déchaînante, à vingt-quatre heures d'intervalle, tue l'animal en réalisant le tableau classique du phénomène de Sanarelli. La première injection déchaînante a fait fonction d'injection préparante par voie vasculaire non limitée, d'où l'apparition, après la deuxième déchaînante, d'une réaction de Sanarelli généralisée. Par contre, une préparation vasculaire limitée détermine une réaction de Sanarelli localisée qui, en réalité, n'est autre chose qu'une réaction de Shwartzman.

Or, et c'est là que réside l'intérêt de ces expériences, dans tous ces phénomènes, locaux ou généraux, il ne s'agit pas d'une réactivité particulière de la peau ou des viscères, mais bien d'une réactivité essentielle des vaisseaux.

Dans le cas du phénomène de Shwartzman, ce sera le réseau capillaire cutané qui réagira ; dans le cas du phénomène de Sanarelli, ce seront les réseaux capillaires des viscères. Il ne s'agit que d'une simple différence de localisation vasculaire, le mécanisme essentiel de production est le même ; nous sommes donc autorisé à conclure à l'identité des deux phénomènes.

Depuis que nous avons fait connaître [**17**] à la Société de Biologie, en mars 1935, ce mode de préparation vasculaire locale, des confirmations aussi bien par Sanarelli que par Shwartzman ont été signalées.

Lors d'une séance spécialement consacrée aux phénomènes hémorragiques, à la première Semaine Internationale de Montreux (9-14 septembre 1935), à laquelle nous avons exposé nos observations [**18**], Sanarelli a bien voulu confirmer verbalement nos résultats.

En novembre de la même année, Shwartzman, utilisant notre mode de préparation, a réussi à réduire au minimum le temps de préparation. Mais il modifiait pour cela la perméabilité vasculaire de la région préparée, soit en la chauffant, soit en ajoutant au filtrat bactérien une substance telle que l'extrait testiculaire de Duran-Reynals [**19**], qui s'est révélé particulièrement perméabilisant. Dans ces conditions, il suffisait de maintenir le filtrat dans les vaisseaux capillaires de l'oreille ligaturée, pendant cinq minutes, pour assurer une imprégnation de la région traitée. Et lorsque après trente minutes ou dans les vingt-quatre heures qui suivent, il pratiquait l'injection déchaînante par la veine marginale de l'oreille opposée, la réaction hémorragique apparaissait là seulement où l'injection préparante avait été pratiquée.

Il faut pourtant souligner que, pour réussir notre expérience de préparation vasculaire locale avec le filtrat seul, il est nécessaire de garder la ligature au minimum quatre heures et au maximum six heures. Ces limites, auxquelles nous sommes arrivé par tâtonnement, permettent d'obtenir une

bonne imprégnation du réseau vasculaire, sans qu'il se produise de troubles résultant d'une compression trop prolongée. C'est ce terme de six heures que nous avons utilisé le plus souvent, lorsque nous nous servions de filtrat ordinaire.

Mais on peut aussi opérer les deux injections, préparante et déchaînante, simultanément, à condition de garder le filtrat préparant emprisonné dans le territoire vasculaire oblitéré pendant le temps suffisant pour permettre sa fixation. Cette expérience a été déjà rapportée [20] dans une note préliminaire.

Chez 3 lapins A, B et C, on comprime la base d'une oreille suivant notre technique. Le lapin A reçoit 0 c. c. 5 du filtrat de *B. coli V* dans la veine marginale de l'oreille liée et en même temps 1 cent. cube du même filtrat dans la circulation générale par la veine marginale de l'oreille opposée. Le lapin B ne reçoit qu'une seule injection de 1 cent. cube du filtrat dans la circulation générale et rien dans les veines de l'oreille liée. Le lapin C ne reçoit qu'une injection de 0 c. c. 5 du filtrat dans les vaisseaux de l'oreille liée et rien dans la circulation générale.

Cela fait, on attend quatre à six heures et on enlève la ligature chez les 3 animaux en expérience. Déjà, après deux heures environ, on remarque que l'oreille préparée du lapin A s'empourpre, s'alourdit, devient flasque et, dans les vingt-quatre heures, il s'y développe un purpura hémorragique étendu à toute la surface. Les lapins B et C ne présentent aucun de ces symptômes.

Il est remarquable de voir ce phénomène se vérifier également dans l'expérience de Shwartzman [21]. Cet auteur injecte dans la veine marginale de l'oreille ligaturée, un mélange de filtrat et d'extrait testiculaire. Cinq minutes plus tard, il enlève la ligature pour rétablir la circulation. Et, lorsque trente minutes après, il pratique l'injection déchaînante, il voit déjà apparaître l'accident hémorragique dans l'oreille ainsi préparée.

Le temps de préparation à la réaction de Shwartzman peut donc être singulièrement abrégé. Dans l'exemple de Shwartzman, il n'est plus que de quelques minutes, grâce à la présence d'un extrait testiculaire. Dans nos expériences où le filtrat est introduit seul, le temps de préparation est de quelques heures. Nous avons pu, cependant, obtenir la préparation vasculaire locale, en deux heures, et parfois même en dix ou quinze

minutes, lorsque nous avons employé, à cette fin, une ondotoxine au lieu de filtrat. Son activité s'est révélée particulièrement énergique et rapide ; nous aurons l'occasion de revenir sur ses propriétés, intéressantes encore à d'autres points de vue.

Signalons enfin que la préparation dermique peut être également accélérée. Le pouvoir de la colitoxine, par exemple, peut être renforcé par simple addition d'un sérum sanguin quelconque.

Si, en effet, on injecte dans la peau d'un lapin un mélange de 0 c. c. 5 de filtrat colibacillaire et de 1 cent. cube de sérum normal et que, quatre heures plus tard, on introduit dans la veine marginale de l'oreille 1 ou 2 cent. cubes de filtrat pur, la réaction hémorragique apparaît dans la région de la peau préparée avec le mélange.

Le phénomène de Sanarelli-Shwartzman et l'anaphylaxie.

Dans les lignes qui précèdent, nous avons indiqué les conditions dans lesquelles le phénomène de Sanarelli et le phénomène de Shwartzman peuvent se réaliser, et nous avons confirmé, grâce à une technique nouvelle, que les deux phénomènes sont identiques. Mais il paraît nécessaire de préciser, en outre, qu'ils se différencient des réactions locales de l'anaphylaxie. Du fait que deux injections, l'une préparante, l'autre déchaînante, sont nécessaires à la production du phénomène de Sanarelli-Shwartzman, il était inévitable qu'un rapprochement s'établît dans l'esprit des chercheurs et que ceux-ci fussent tentés d'y rechercher les caractères classiques du phénomène d'Arthus.

Sanarelli [3] fut le premier à affirmer que son phénomène est de nature anaphylactique et Zdrodovski [5], puis Gratia et Linz [11] partagèrent son idée. Plus tard, Gratia et Linz [22] firent rentrer les réactions de Sanarelli et de Shwartzman dans le cadre de l'allergie et, en raison du caractère hémorragique de ces phénomènes, proposèrent la dénomination d'« allergie hémorragique ».

Or, il ne nous semble pas que l'assimilation avec l'anaphylaxie puisse se soutenir ; l'allergie ne nous paraît avoir que des

analogies bien discutables avec les phénomènes de Sanarelli et de Shwartzman, à moins de prendre ce vocable dans un sens étymologique tellement vaste qu'il perd toute signification. Du reste, aucun de ces auteurs n'a apporté de preuves expérimentales décisives à l'appui de l'origine anaphylacto-allergique des phénomènes hémorragiques. Quant à Shwartzman [23], nous savons que, lui aussi, lors de ses premières observations sur le phénomène qu'il étudiait, avait pensé à l'anaphylaxie, mais qu'il changea bientôt d'opinion, lorsqu'il vit que le sérum de cheval, dont on sait la valeur anaphylactogène, se montrait totalement inefficace à la production de la réaction hémorragique. De plus, il fit remarquer que la réaction est exempte de toute spécificité, c'est-à-dire que l'hémorragie peut être déchaînée par un filtrat microbien différent de celui qui a servi à l'injection préparante. D'autre part, Shwartzman signala le fait que, dans sa réaction, le délai qui s'écoule entre les deux injections n'est pas celui de l'anaphylaxie. Dans le premier cas, il est bref, et, une fois ce délai dépassé, la réaction n'apparaît plus. Dans le second cas, il est long à s'établir, et, une fois établi, persiste longtemps. Enfin, contrairement à l'anaphylaxie, le phénomène hémorragique n'est pas réalisable par voie passive.

A ces arguments de Shwartzman, qui par eux-mêmes sont déjà assez suggestifs, nous pouvons ajouter, et ceci est important, que le sérum de cheval est non seulement incapable à lui seul de réaliser la réaction hémorragique, mais que ce sérum reste encore inefficace chez les animaux anaphylactisés vis-à-vis de ce même antigène, en respectant, bien entendu, les conditions exigées pour l'obtention du phénomène de Sanarelli et de Shwartzman.

Cependant, certains auteurs ont prétendu, malgré tout, que le phénomène de Shwartzman peut, dans certaines conditions, être transmis par voie passive (Gratia et Linz) [24], que le sérum de cheval convient aux injections préparantes et déchaînantes, au même titre que le filtrat microbien (Albus, Gunther et Schwartz, Hugo) [25], et que le phénomène de Shwartzman est comparable au phénomène d'Arthus (Gratia et Linz) [26].

Bien que la réfutation de ces différents points sorte du cadre du présent travail, nous essayerons cependant de montrer

brièvement, que toutes ces affirmations ne reposent pas sur des bases expérimentales conformes aux règles admises pour faire apparaître le phénomène de Sanarelli-Shwartzman.

Si, en effet, dans ces cas particuliers, comme nous l'avons constaté nous-même, l'hémorragie apparaît, c'est par suite non d'un phénomène d'anaphylaxie pur, mais de l'action combinée de la toxine bactérienne et du sérum de cheval sur l'organisme animal qui se trouve en état d'anaphylaxie.

Prenons comme exemple l'expérience suivante: A un lot de 30 lapins, nous injectons dans la peau du flanc, 1 ou 2 cent. cubes de sérum de cheval. Le sérum injecté est rapidement absorbé sans laisser de traces. Après un intervalle de vingt-quatre heures, nous leur injectons dans les veines 3 ou 4 cent. cubes du même sérum. Cette inoculation, très bien supportée également, n'entraîne aucune réaction locale à l'endroit de la première injection. Ceci est bien la preuve que dans ces conditions expérimentales le phénomène hémorragique ne se réalise pas à l'aide de cet antigène.

Continuons l'expérience vingt et un jours plus tard, sur ces mêmes lapins, qui sont à présent anaphylactisés vis-à-vis du sérum de cheval. Nous leur injectons dans la peau du dos, 0 c. c. 2 du sérum de cheval dilué au 1/20. Cette fois la peau réagit, il apparaît une papule épaisse marquée d'un érythème plus ou moins intense. Faisons alors, après vingt-quatre heures d'intervalle, une injection intraveineuse de 2 cent. cubes du sérum à la même dilution. Ici encore, on ne voit pas apparaître de réactions hémorragiques. Cependant, 5 lapins ont succombé d'un choc anaphylactique foudroyant. Leur autopsie ne démontre que de la simple congestion viscérale avec stase veineuse, mais sans la moindre suffusion sanguine. 12 ont présenté des symptômes d'anaphylaxie nette, mais non mortelle, avec émission de matières fécales et d'urine ; les 13 derniers sont restés couchés sur le flanc avec respiration accélérée Au bout d'une heure, ces deux derniers lots étaient complètement rétablis.

La conclusion que nous pouvons tirer de ces expériences, est que chez le lapin anaphylactisé classiquement au sérum de cheval, le phénomène hémorragique ne se réalise pas avec cet antigène.

Mais, voici où les faits deviennent vraiment suggestifs : chez les animaux anaphylactisés, la réaction de Shwartzman peut apparaître, à condition que l'injection déchaînante soit pratiquée à l'aide d'un filtrat microbien.

A 12 lapins anaphylactisés par le même procédé que dans l'expérience précédente, nous injectons dans la peau de la cuisse gauche, vingt et un jours après la première injection, 0 c. c. 2 du sérum de cheval au

1/20 et dans la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes du filtrat de *B coli*. Le lendemain, nous constatons que chez 3 lapins il apparaît déjà des taches hémorragiques à l'endroit préparé par le sérum, tandis que les 9 autres présentent des deux côtés de l'érythème avec infiltration œdémateuse. A ce moment, nous injectons dans les veines de ces 9 lapins, 1 cent. cube du filtrat de *B. coli*. Quelques heures plus tard, le phénomène hémorragique apparaît aussi bien du côté préparé avec le sérum que du côté préparé avec le filtrat.

Du fait que 3 des lapins ont donné d'emblée une réaction hémorragique avant l'injection déchaînante, on peut se demander si le filtrat préparant injecté d'un côté ne vient pas intensifier l'action du sérum préparant injecté de l'autre côté.

Pour nous en rendre compte, nous préparons une nouvelle série de 12 lapins anaphylactisés au sérum de cheval et nous leur injectons 0 c. c. 2 du sérum dilué au 1/20 dans la peau du flanc et en même temps 2 cent. cubes du filtrat dans les veines. Six heures plus tard, nous constatons que 5 lapins sont déjà porteurs d'une plaque hémorragique typique de Shwartzman, à l'endroit préparé par le sérum ; chez les 7 suivants, les endroits sériques sont œdématiés et érythémateux. Le lendemain, nous injectons dans les veines de ces 7 derniers, 1 cent. cube du filtrat. Quelques heures plus tard, nous trouvons 3 de ces lapins morts. A l'autopsie, ils présentent la réaction viscérale de Sanarelli. Les trois lapins restant ont présenté la réaction de Shwartzman.

Enfin, à un troisième lot de 6 lapins anaphylactisés, nous injectons, dans la peau, 0 c. c. 2 du sérum dilué, et, vingt-quatre heures après, 1 cent. cube du filtrat dans les veines. Le lendemain, 4 lapins ont manifesté une réaction hémorragique, les 2 autres n'ont pas réagi.

Donc, seuls les animaux anaphylactisés au sérum de cheval peuvent être préparés à la réaction de Shwartzman avec cet antigène. Pour déclencher l'hémorragie, il est indispensable d'utiliser un filtrat déchaînant. Toutefois, le phénomène hémorragique peut se rencontrer d'emblée, sans l'injection déchaînante, si la toxine microbienne se trouve déjà à ce moment dans le sang circulant. Mais il ne faut pas confondre ce résultat avec le phénomène d'Arthus, comme l'ont fait certains auteurs. Le phénomène d'Arthus a, en effet, des caractères distinctifs qui le séparent indubitablement du phénomène de Shwartzman. Il apparaît, on le sait, au moins dix jours après l'injection d'une protéine (sérum de cheval), mais il est plus marqué si l'animal a reçu plusieurs injections à quelques jours d'intervalle.

La réaction de Shwartzman consiste, au contraire, en un

phénomène hémorragique profus, atteignant d'emblée son maximum quelques heures après la déchaînante. Le phénomène d'Arthus est toujours bénin, lorsque le sujet a reçu une seule injection d'antigène, à moins que celle-ci ne soit très volumineuse : il ne devient vraiment intense, avec lésions hémorragiques et nécrotiques, qu'après des semaines de sensibilisation au même antigène.

De plus, le phénomène d'Arthus est transmissible passivement, comme du reste tout phénomène anaphylactique pur. Le phénomène de Shwartzman ne l'est pas. On sait que le sérum et le sang défibriné d'animaux préparés en vue du phénomène de Shwartzman (c'est-à-dire ayant reçu depuis vingt-quatre heures une injection de coli toxine préparante), ne peuvent conférer à un animal neuf l'état de préparation. Nos essais concordent à ce point de vue avec ceux de Bock [27], de Shwartzman [23], de Paul Bordet [28], et d'autres encore.

Gratia et Linz [24] ont recherché, par l'expérience suivante, s'il n'apparaissait pas dans la région préparée, des substances nouvelles capables de provoquer la réaction passivement chez un animal neuf.

Un fragment d'éponge, imbibé de filtrat de *B. coli*, est introduit sous la peau d'un lapin. Vingt-quatre heures plus tard, la région ainsi préparée devient érythémateuse et œdématiée. On retire l'éponge et on exprime le liquide qu'elle contient. Le suc obtenu est introduit dans la peau d'un lapin neuf, auquel, quatre ou cinq heures plus tard, on injecte dans la veine le filtrat de *B. coli*. La réaction hémorragique, caractéristique du phénomène de Shwartzman, apparaît bientôt. Gratia et Linz en ont conclu, d'abord, qu'il y avait transmission passive puisque, dans leur expérience, un délai de quatre heures était suffisant, alors que la préparation active habituelle demande bien davantage. Mais ils ont dû abandonner cette conclusion lorsqu'ils ont vu ultérieurement que l'intervalle de temps entre les deux injections dans le Shwartzman typique peut être réduit à cinq ou six heures. D'autre part, leur expérience n'excluait pas la possibilité de la présence, dans le liquide exprimé, d'un peu de filtrat subsistant dans l'éponge et rendant ce liquide actif.

Bien que l'expérience de Gratia et Linz n'apporte pas de

certitude à la transmission passive, elle demeure néanmoins instructive et nous allons tâcher d'en dégager l'importance [29].

Introduisons sous la peau d'un premier lapin le fragment d'éponge imbibé de filtrat. Après vingt-quatre heures, la peau de la région est congestionnée et œdématiée. Au lieu de retirer à ce moment l'éponge, comme l'ont fait Gratia et Linz, effectuons l'injection déchaînante. La réaction hémorragique apparaît. Retirons alors l'éponge, exprimons le liquide qu'elle contient et injectons un peu de ce liquide dans la peau d'un lapin neuf. Lorsqu'après quatre heures on pratique l'injection déchaînante à l'aide du filtrat de *B. coli* chez ce deuxième lapin, on assiste au développement de la réaction de Shwartzman typique. Une partie du filtrat introduit avec l'éponge avait donc diffusé dans le tissu cutané du premier sujet, puisque l'injection déchaînante a provoqué la réaction, mais il faut admettre qu'il en restait suffisamment dans l'éponge, pour que ce liquide exprimé fût apte à préparer un lapin neuf. Il semble, d'autre part, que l'intervalle puisse être singulièrement réduit lorsqu'on se sert de ce liquide exprimé de l'éponge.

Or, lorsque nous avons voulu reproduire la transmission passive par la méthode de Prausnitz-Kustner [30], nous avons échoué [29] et cependant le sérum injecté localement n'est pas complètement inactif. En effet, si on injecte dans la peau du flanc gauche d'un lapin neuf du sérum de lapin préparé et, vingt-quatre heures plus tard, dans la même région, 0 c. c. 25 du filtrat, on n'observe aucune réaction hémorragique, pas plus qu'au niveau de l'injection de contrôle (filtrat neuf) pratiquée dans la peau du flanc droit. Si, après quatre heures, on effectue par voie veineuse l'injection déchaînante, la réaction hémorragique survient uniquement au niveau de la région qui a reçu successivement le sérum et le filtrat.

Il faudrait pourtant se garder d'en conclure que le sérum de lapin préparé a exercé une action spécifique en raison même de cette préparation ; si on pratique l'expérience en injectant du sérum de lapin neuf ou même d'un animal neuf d'espèce différente, le résultat est identique. La propriété de favoriser l'action préparante du filtrat et d'abréger le délai nécessaire entre les injections préparantes et déchaînantes, appartient en réalité à tout sérum et, peut-être, nous le verrons, à d'autres humeurs de l'organisme. Il n'est d'ailleurs pas nécessaire que l'injection préparante et l'injection de sérum soient faites séparément. Si on injecte dans la peau d'un lapin neuf un mélange de 0 c. c. 5 de filtrat et de 1 cent.

cube de sérum normal, et si, quatre heures plus tard, on introduit dans la veine marginale de l'oreille 1 cent. cube de filtrat pur, la réaction hémorragique apparaît dans la région préparée avec le mélange. Il est donc évident que l'addition de sérum à la toxine active son pouvoir préparant à l'égard du phénomène de Shwartzman. C'est peut-être l'explication des résultats de Gratia et Linz : le liquide contient non seulement du filtrat, mais des humeurs provenant des tissus enflammés. Ce sont elles, nous allons le voir, qui accentuent l'activité préparante du filtrat. Pour le prouver, il fallait comparer l'action du suc extrait : 1° du derme préparé par le filtrat de *B. coli* ; 2° du tissu où s'est développée la réaction hémorragique à la suite de l'injection déchaînante. Dans ce but, on excise un fragment de peau, qu'on place dans un mortier. Après l'avoir coupé finement, on le triture en présence de sable stérile, en y ajoutant progressivement un peu d'eau physiologique ou de bouillon ordinaire. On obtient ainsi une émulsion homogène qu'on centrifuge dix minutes. Le liquide surnageant est filtré sur bougie et utilisé ensuite comme matériel d'injection [**31**].

Le fragment de peau est prélevé, d'une part, dans une région qui a reçu, vingt-quatre heures auparavant, 0 c. c. 5 de filtrat de *B. coli* ; d autre part, dans une région où la réaction de Shwartzman est apparue à la suite de l'injection déchaînante. Le liquide obtenu dans les deux cas est injecté à 3 lapins neufs, dans la peau de l'abdomen, à raison de 2 cent. cubes par animal. Déjà, après une heure environ, la région ainsi préparée devient érythémateuse, présentant de l'empâtement et de l'œdème. Après quatre heures, exactement, nous pratiquons l'injection de filtrat de *B. coli* dans les veines. Au bout de deux, trois heures le plus souvent, la réaction apparaît en présentant une hémorragie d'intensité variable, parfois même considérable. Il n'y a pas de différence suivant que le lambeau de peau a été prélevé avant l'injection ou après l'apparition du phénomène. Une vingtaine d'extractions ainsi obtenues et éprouvées dans les mêmes conditions expérimentales, par séries de 3 ou 4 lapins normaux, nous ont donné le plus souvent des résultats positifs.

Comme contrôle, nous avons utilisé : 1° L'extrait de peau saine ; 2° l'extrait de peau enflammée, soit avec du bouillon ordinaire ou du tapioca, soit avec un irritant tel que la térébenthine. Ces extraits n'ont pas réalisé la préparation au phénomène de Shwartzman, et cet échec prouve la nécessité de la présence de colitoxine.

En effet, prenons 2 lapins de poids sensiblement égal ; injectons, dans le derme du flanc de chacun d'eux, un mélange composé de 1 cent. cube d'extrait de peau provenant d'un lapin normal et de 0 c. c. 5 de

filtrat de *B. coli* ; quatre heures plus tard, introduisons par voie veineuse aux animaux qui forment l'objet de cette expérience, 1 cent. cube du même filtrat. Au bout de quelques heures, l'accident hémorragique se produit aux endroits préparés.

En résumé : 1° l'extrait de peau préparée au filtrat colibacillaire est aussi capable de préparer un animal neuf à la réaction hémorragique que le filtrat lui-même ; celui-ci a donc conservé toutes ses propriétés, après vingt-quatre heures de contact avec le tissu cutané ; 2° l'extrait d'une région cutanée ayant donné la réaction hémorragique après la déchaînante, manifeste encore les mêmes capacités préparantes pour l'animal neuf ; le filtrat n'a subi aucune espèce de « neutralisation » par le fait de la réaction ; 3° l'extrait de peau normale, additionné de filtrat, se comporte, en injection préparante, comme l'extrait de peau préparée.

Nous pouvons donc conclure avec certitude : 1° qu'il n'y a pas formation de substances actives ou anticorps, au siège de l'injection préparante ; 2° que la transmission passive qu'on réalise n'est pas autre chose qu'un transport de filtrat rendu plus actif par la présence de suc tissulaire. L'augmentation de l'activité se traduit par l'obtention plus rapide du phénomène hémorragique.

Ainsi, nous souscrivons volontiers à la conclusion de Shwartzman, en disant que son phénomène hémorragique n'a rien de commun avec l'anaphylaxie et l'ensemble des nombreux faits rapportés nous autorise à repousser toute idée d'identité entre eux.

La substance active de Sanarelli-Shwartzman.

Il est bien établi, actuellement, que seules les bactéries sont capables de nous fournir la substance active à la production de phénomènes hémorragiques de Sanarelli et Shwartzman. Elle est présente dans les cultures et on la retrouve encore dans les filtrats de ces cultures. Sanarelli, pour provoquer sa réaction, utilise comme injection préparante la culture telle quelle, comme injection déchaînante, des filtrats. Shwartzman, lui, n'emploie que des filtrats. Gratia et Linz ont montré que le phénomène de Sanarelli, lui aussi, peut être réalisé, comme

celui de Shwartzman, en utilisant des filtrats pour les deux injections. Shwartzman prépare ses filtrats de deux façons : il filtre sur bougie ou bien des cultures en bouillon de six jours, ou bien des émulsions en eau physiologique de vingt-quatre heures sur gélose. Comme l'expérience nous a montré que la première méthode donne un meilleur rendement en substance active, c'est elle que nous avons utilisée pour nos recherches. F. Burnet, lui aussi, a constaté que ce sont les vieilles cultures en bouillon qui recèlent le plus de substances actives et donnent les meilleurs résultats. Ceci a été confirmé par Gratia et Linz.

En ce qui concerne le bacille typhique-paratyphique A et B, le colibacille, le bacille de Morgan et le vibrion cholérique, nous pouvons affirmer que la différence d'activité du filtrat de culture sur gélose de vingt-quatre heures et du filtrat de culture sur bouillon de six jours est considérable.

Expérience 1. — Une boîte de Roux, contenant de la gélose, est ensemencée de 3 ou 4 cent. cubes de culture de *B. coli V*, en bouillon. Après vingt à vingt-quatre heures d'incubation dans l'étuve à 37°, la culture est lavée avec 10 cent. cubes d'eau physiologique stérile. On laisse sédimenter l'émulsion pendant deux heures à la glacière, puis on centrifuge. Le liquide surnageant est filtré sur bougie L 3 immédiatement après la centrifugation. A 3 lapins de 1.500 grammes, nous injectons, dans la peau du flanc, 0 c. c. 5 de ce filtrat ; vingt-quatre heures plus tard, nous introduisons, dans la veine marginale de l'oreille, 1 cent. cube du même filtrat par kilogramme d'animal. Le lendemain, 2 lapins ont réagi et présentent chacun une petite tache hémorragique d'environ 1 à 2 centimètres de diamètre. Le troisième lapin ne montre qu'une simple réaction papuleuse avec un léger érythème.

Expérience 2. — On ensemence de *B. coli V* un ballon contenant 200 cent. cubes de bouillon. On laisse incuber pendant six jours à 37°. Puis on centrifuge la culture et on filtre sur bougie L 3. Nous injectons 0 c. c. 5 de ce filtrat dans la peau du flanc de 3 lapins de 1.500 grammes. Après vingt-quatre heures nous leur injectons, dans la veine marginale de l'oreille, 1 cent. cube du même filtrat par kilogramme d'animal. Le lendemain, les 3 lapins ont présenté de larges plaques hémorragiques de 7 à 8 centimètres de diamètre.

A titre d'illustration, nous rapportons ici les photographies de ces réactions. On y voit que la différence entre la réaction obtenue avec le filtrat de culture sur gélose de vingt-quatre heures (fig. 6) et celle provoquée par le filtrat de culture en bouillon (fig. 7) est énorme. Nous avons répété les expériences

avec les diverses souches microbiennes précitées et les résultats ont été rigoureusement identiques. Nous avons également comparé l'intensité de la réaction en travaillant avec des filtrats obtenus de cultures en bouillon âgées de un à six jours. Les résultats de ces différentes réactions peuvent être résumés comme suit : Plus la culture microbienne est vieille, plus elle sera riche en substances actives et plus la réaction hémorragique locale sera intense. Ce fait peut être encore mieux mis en évidence par l'expérience que nous avons pu réaliser avec le staphylocoque [**32**]. Dans les expériences relatées par Burnet, Gratia et Linz, et Shwartzman lui-même, ce germe s'était montré totalement inactif à la réalisation du phénomène hémorragique. Cependant, en utilisant pour l'injection préparante des doses massives de filtrat staphylococcique (25 cent. cubes), H. Gross [**33**] avait réussi à le déclencher.

Dans un cas de dermatite herpétiforme de Dühring, nous avons isolé, du liquide des vésicules éruptives, un staphylocoque doré. Une culture de ce germe en bouillon, vieille de vingt jours et filtrée, a été utilisée comme matériel d'expérience.

Nous injectons à trois lapins adultes 1 cent. cube de ce filtrat dans la peau de la fesse, et, le lendemain, 2 cent. cubes du même filtrat dans les veines. Déjà, quelques heures après l'injection intraveineuse, on constate à l'endroit de primo-injection des points purpuriques qui ne tardent pas à confluer pour former bientôt une tache hémorragique de 1 à 2 centimètres de diamètre ; à la vérité, elle est moins marquée que la lésion provoquée dans les mêmes conditions par le filtrat de colibacille ; elle ne donne pas de nécrose et s'efface en trois ou quatre jours, sans laisser de traces visibles à la peau. Mais si, au lieu de faire toute l'expérience avec le filtrat staphylococcique, on utilise pour l'une des deux injections préparante ou déchaînante le filtrat de coli, et pour l'autre le filtrat de staphylotoxine, les accidents sont beaucoup plus marqués, voire même violents.

5 lapins de 2 kilogrammes reçoivent dans la peau de la cuisse 1 cent. cube de filtrat-coli Après vingt-quatre heures, nous pratiquons par voie veineuse l'injection déchaînante de 2 cent. cubes du filtrat-staphylo. Le lendemain, on trouve chez 4 animaux une forte réaction hémorragique à l'endroit de l'injection préparante. Le cinquième lapin présente un érythème marqué avec œdème.

Inversement, 6 autres lapins, de 2.000 à 2.600 grammes, reçoivent dans la peau de la cuisse 1 cent. cube du filtrat-staphylo, et, vingt-quatre heures plus tard, 2 cent. cubes du filtrat-coli dans les veines. Le lendemain, on trouve 1 lapin mort, présentant dans la région de l'injection cutanée une plaque hémorragique très développée. 3 autres lapins

présentent une forte réaction de 3 à 4 centimètres de diamètre, qui se nécrose trois jours plus tard. Chez les deux derniers, un simple érythème congestif est apparu au siège de l'inoculation préparante.

Les échecs signalés plus haut par les auteurs, qui, les premiers, utilisaient le staphylocoque, sont vraisemblablement dus au fait qu'ils employaient des cultures trop jeunes pour que la substance active s'y trouve en concentration suffisante. Ce n'est qu'en travaillant avec des doses considérables de filtrats que Gross est parvenu à obtenir la réaction. En nous servant pour nos expériences de filtrats de cultures âgées de vingt jours, nous avons toujours eu des résultats positifs, même en employant des doses faibles. En somme, la production de substances actives paraît plus lente pour le staphylocoque que pour les autres germes utilisés. C'est pourquoi il faut attendre plus longtemps pour que la culture se soit suffisamment enrichie.

INJECTION PRÉPARANTE.

Sanarelli effectue l'injection préparante directement dans le sang par voie veineuse. Le produit injecté est rapidement entraîné par le courant sanguin et se répand dans toute la circulation. On sait que, dans ces conditions, lors de l'injection déchaînante, l'hémorragie apparaît dans un ou plusieurs viscères. Pour expliquer cette localisation, on peut admettre que la substance préparante de la première injection se fixe dans le tissu parenchymateux et crée une lésion capable de préparer un terrain local favorable au développement hémorragique.

En effet, Sanarelli a montré que, si l'injection préparante est pratiquée au sein même d'une glande ou d'un organe (l'appendice, le cæcum ou une plaque de Peyer), l'hémorragie peut apparaître au niveau de ces organes après l'administration intraveineuse de l'injection déchaînante.

De même, lorsque Shwartzman pratique l'injection préparante dans le derme, il se produit, à l'endroit où le filtrat est injecté, une lésion locale se traduisant par une tache érythémateuse avec empâtement séreux, qui deviendra hémorragique après l'injection déchaînante. Ce même auteur a aussi

montré que, s'il pratique l'injection préparante dans un poumon ou dans un rein, ce sera dans ces organes que l'hémorragie se déclenchera. On voit donc que la localisation des phénomènes, ainsi provoqués par les produits bactériens, ne doit rien au hasard et c'est bien l'emplacement de l'injection préparante qui détermine le lieu où l'injection déchaînante suscitera la réaction hémorragique.

Mais, si l'injection déchaînante a comme effet de déclencher le phénomène, elle est capable aussi de jouer le rôle d'injection préparante. Nous y avons déjà fait allusion au début de cette étude. Au cours d'une réaction locale de Shwartzman, si l'on fait une deuxième injection déchaînante à vingt-quatre heures d'intervalle de la première, on déclenche, dans ces conditions, une réaction généralisée de Sanarelli dans les viscères.

Prenons un premier exemple : injectons dans le derme d'un lapin 0 c. c. 5 du filtrat de *B. coli* et, vingt-quatre heures après, 1 cent. cube dans la veine. Quelques heures plus tard, la réaction de Shwartzman se déclare à la peau. Attendons encore vingt-quatre heures et faisons à ce lapin une deuxième injection intraveineuse de 2 cent. cubes du même filtrat. L'animal succombe. A l'autopsie, on constate une réaction viscérale typique de Sanarelli. Comme on peut s'en rendre compte par les figures 8, 9, 10, les localisations hémorragiques peuvent être multiples et très variées. Outre la réaction cutanée de Shwartzman, on trouve un purpura de tout le gros intestin, des taches hémorragiques plus ou moins étendues dans l'intestin grêle; les reins sont entièrement hémorragiques, ponctués de pétéchies ; la vessie est congestionnée avec dilatation veineuse ; le péritoine et le diaphragme présentent de larges ecchymoses.

En voici un autre exemple : comprimons la base de l'oreille d'un lapin, avec deux bâtonnets en bois, et introduisons dans la veine marginale de cette oreille 0 c. c. 5 du filtrat colibacillaire. Après cinq ou six heures, libérons l'oreille de sa ligature et, vingt-quatre heures plus tard, injectons dans la veine marginale de l'oreille opposée 1 ou 2 cent. cubes du même filtrat microbien. Le lendemain, la réaction de Shwartzman se développe à l'oreille préparée. A ce moment, faisons, par la même voie, une deuxième injection de filtrat. Le plus souvent, l'animal meurt quelques heures plus tard et l'autopsie montre les hémorragies caractéristiques de Sanarelli. En se référant aux clichés, on constate une grande plaque hémorragique, avec nécrose, à la paroi antérieure de l'estomac (fig. 11) ; on trouve des taches semblables, mais moins marquées, dans les poumons (fig. 12) ; la rate est noire de sang infiltré. L'oreille présente une nappe hémorragique, couvrant environ 2/3 de sa surface (fig. 13).

Ici encore nous voyons qu'à l'aide de trois injections, dont une pratiquée dans un territoire vasculaire bien délimité et

les deux autres dans la circulation générale, on réalise d'emblée le phénomène de Sanarelli et de Shwartzman, mais avec cette différence que cette fois aucune de ces injections n'a été pratiquée ni dans le tissu viscéral, ni dans le tissu cutané. C'est donc la lésion vasculaire qui est primitive ; le tissu parenchymateux voisin n'est atteint que secondairement, par suite de l'épanchement sanguin consécutif à la rupture des capillaires.

Pour confirmer la participation de l'endothélium vasculaire à ces phénomènes hémorragiques, nous avons imaginé l'expérience suivante :

On sait que, lorsqu'on ponctionne la chambre antérieure de l'œil, l'humeur aqueuse est rapidement remplacée par un liquide de même composition que le sérum sanguin, ce qui atteste une augmentation de la perméabilité vasculaire du corps ciliaire. Ce fait a servi de point de départ à l'expérience suivante :

On ponctionne l'œil gauche d'un lapin et on retire environ 0 c. c. 25 d'humeur aqueuse ; immédiatement après, on injecte dans la circulation générale, par la veine auriculaire, 0,5 à 1 cent. cube de filtrat microbien (*B. coli* ou B. de Morgan). Après un délai de vingt-quatre heures, on injecte, par la même voie intraveineuse, 2 cent cubes du même filtrat. Le lendemain, l'examen du segment antérieur de l'œil révèle déjà une forte dilatation des vaisseaux de l'iris et une injection ciliaire. On sacrifie l'animal et on inclut les deux yeux pour un examen histologique. Pour l'œil gauche ponctionné, les coupes révèlent une extravasation très marquée de globules rouges ; on voit nettement par place des ruptures dans les parois endothéliales des petits capillaires veineux L'œil droit ne présente aucun de ces signes et paraît normal.

A titre de contrôle, nous avons refait ces examens histologiques sur des yeux de lapins témoins :

1° N'ayant pas subi de ponction de la chambre antérieure et ayant reçu : *a*) uniquement l'injection préparante ; *b*) les deux, préparante et déchaînante.

2° N'ayant subi que la ponction de la chambre antérieure, sans injection, ni préparante, ni déchaînante.

3° N'ayant subi ni ponction de la chambre antérieure. ni injection.

Aucun de ces contrôles ne présentait d'altérations hémorragiques.

4° Enfin, les lapins ayant reçu une injection préparante après la ponction de la chambre antérieure ont présenté de la congestion dans le corps ciliaire avec œdème, sans manifestations hémorragiques. C'est ici que nous pouvons saisir le mieux les modifications qui indiquent l'état de préparation correspondant, en somme, à une fragilisation du système vasculaire. La ponction de la chambre antérieure, en accentuant la perméabilité du corps ciliaire, y a créé un *locus minoris resistentiæ*, un endroit d'élection pour la production du phénomène hémorragique (fig. 14, 15, 16).

Pour conclure, nous croyons à présent pouvoir préciser le mécanisme du phénomène hémorragique de Sanarelli-Shwartzman de la façon suivante :

Lorsque l'injection préparante est faite directement dans le torrent sanguin ou dans les veines d'un territoire limité, la substance active traverse la membrane cellulaire endothéliale des vaisseaux capillaires et se fixe dans le tissu parenchymateux, une réaction inflammatoire locale s'installe et augmente la perméabilité des petits vaisseaux capillaires de la région intéressée. Lors de l'injection déchaînante, la toxine microbienne, arrivée à l'endroit préparé, accentue la lésion résultant de la première injection ; la rupture des capillaires se produit et l'hémorragie apparaît.

Si l'injection préparante est effectuée dans le parenchyme d'un viscère ou dans le tissu cutané, la substance active se fixe d'emblée sur le tissu et sur les capillaires qui le sillonnent. Mais elle n'atteint vraisemblablement pas l'endothélium des vaisseaux plus importants, protégés par une tunique adventice.

En définitive, la première injection a comme fonction de provoquer une lésion préparatoire au phénomène hémorragique.

La deuxième injection a comme fonction de déclencher l'hémorragie dans l'endroit préparé ; mais, en même temps, elle peut jouer le rôle d'injection préparante en créant ailleurs de nouvelles lésions préparantes.

Il n'existe donc pas de tropisme particulier dans ces réactions pour tel ou tel viscère ou organe, puisque l'hémorragie peut apparaître tantôt dans le poumon, tantôt dans le rein ou l'intestin, ou, encore, dans plusieurs organes à la fois.

Le seul « tropisme » que l'on puisse concevoir résulte de la sensibilité particulière de l'endothélium au produit bactérien ; mais la localisation à tel ou tel organe pourra résulter de circonstances parfois passagères telles que, par exemple, le ralentissement de la circulation au moment où le sang, chargé de substance active, se trouve dans l'une ou l'autre région. Ainsi, on verra fréquemment des lésions hémorragiques des ganglions lymphatiques correspondant à la région préparée.

Pour ne pas alourdir cet exposé, nous avons groupé en annexe les observations relatives à l'étude sommaire de l'histopathologie des lésions cutanées ou viscérales provoquées par le phénomène de Sanarelli-Shwartzman ; on y verra l'importance des altérations vasculaires.

Injection déchainante.

En parlant de l'injection préparante, nous avons déjà touché un mot de l'activité de l'injection déchaînante. Nous avons pu remarquer qu'outre son pouvoir déclenchant, elle est capable, en même temps, de remplir le rôle de l'injection préparante. Pendant son passage dans le sang circulant, elle peut se fixer dans les tissus parenchymateux et y créer de nouvelles lésions préparantes. C'est là, sans doute, la véritable raison pour laquelle le filtrat déchaînant, injecté sous la peau ou dans les muscles et retenu à l'endroit même de l'injection, n'arrive pas en concentration suffisante dans la circulation générale pour provoquer l'hémorragie.

Logiquement donc, c'est l'introduction du filtrat déchaînant directement dans le sang par voie veineuse qui donne le maximum de chances de réussite. Mais, cependant, même dans ces conditions, il arrive que la réaction désirée ne se produit pas. On dit alors que l'animal n'est « pas sensible » au phénomène hémorragique. Or, dans ces cas d'insuccès, lorsque nous répétons l'injection intraveineuse, la réaction hémorragique apparaît non seulement à la peau qui n'avait pas réagi la veille, mais aussi dans les viscères. Nous avons cité plus haut des exemples de ce fait que l'on peut répéter à l'infini.

Ils démontrent que l'on ne peut considérer l'animal qui

n'a pas réagi à la première injection déchaînante comme insensible au phénomène hémorragique, puisqu'il a répondu à la seconde injection intraveineuse, comme pour un Sanarelli classique.

Nous croyons donc que la réaction de Sanarelli-Shwartzman est conditionnée par l'activité propre de la toxine injectée et par son aptitude à léser l'endothélium, bien plus que par la sensibilité de l'animal en expérience.

Quelles sont maintenant les autres voies pouvant être utilisées pour l'introduction de l'injection déchaînante ?

Frish [**34**], collaborateur de Shwartzman, puis H. Gross [**35**] ont signalé qu'il est possible de déclencher le phénomène hémorragique en introduisant l'injection déchaînante dans la cavité péritonéale. Ce fait a été confirmé par Gratia et Linz [**22**], par P. Bordet [**16**] et d'autres encore.

Nous avons démontré [**36**], d'autre part, que le canal rachidien peut être aussi utilisé efficacement comme voie d'introduction, et cela quel que soit le mode de préparation utilisé : dermique, vasculaire locale ou générale, ou même rachidienne.

Voici le protocole d'une expérience bien démonstrative :

Sur un lot de 24 lapins de 2 à 3 kilogrammes, 10 reçoivent 0 c. c. 5 de filtrat colibacillaire dans le derme du flanc ou de la cuisse ; 10 autres reçoivent 1 cent. cube du même filtrat par voie intraveineuse ; 4, enfin, reçoivent 0 c. c. 5 du filtrat dans le canal rachidien. Vingt-quatre heures plus tard, à tous les animaux, on injecte, par voie sous-occipitale, dans le liquide céphalo-rachidien, 0,5 ou 1 cent. cube de filtrat, suivant la quantité de liquide extrait. Le lendemain, dans la première série (type Shwartzman), nous trouvons chez 8 lapins une réaction hémorragique intense à l'endroit de l'injection préparante. Dans la deuxième série (type Sanarelli), 5 lapins sont morts, 3 malades et 2 bien portants. L'autopsie des 5 animaux morts révèle des lésions hémorragiques dans les poumons et l'intestin et de la congestion des reins. 2 des 3 lapins malades ont été sacrifiés. Chez ceux-ci, nous avons trouvé des taches hémorragiques dans les poumons, l'intestin et l'épiploon. 1 des 2 lapins bien portants a été sacrifié ; il ne présentait aucune lésion hémorragique. Des 4 lapins qui ont reçu les deux injections dans le canal rachidien, 2 sont morts et, à l'autopsie, nous avons constaté des hémorragies très importantes dans les poumons.

Nous voyons donc que si la voie veineuse est la voie de choix de l'injection déchaînante, on peut aussi utiliser efficacement la voie péritonéale ou la voie rachidienne.

Un point laissé en suspens par les auteurs qui se sont occupés de la question est celui de savoir si le phénomène peut être déclenché par voie sous-cutanée ou musculaire. Nous avons pu démontrer, dès 1935, que c'est possible, à condition d'employer la technique de préparation locale vasculaire [17].

Chez 4 lapins, l'injection préparante du filtrat colibacillaire est faite par voie vasculaire dans l'oreille préalablement ligaturée. Après six heures, la ligature est levée et l'injection déchaînante est faite non par voie veineuse, mais sous la peau du ventre. Dans ces conditions expérimentales, les 4 lapins ont répondu, d'une manière très frappante, par une éruption purpurique et des taches hémorragiques de l oreille préparée.

Dans une autre épreuve, effectuée également sur 4 lapins, nous avons introduit l'injection déchaînante respectivement sous la peau, les muscles, les veines ou dans le péritoine, immédiatement après avoir pratiqué l'injection préparante dans le système vasculaire de l'oreille liée.

Après six heures, la ligature est enlevée, la circulation se rétablit.

Le lendemain, la réaction de Shwartzman est apparue, à des degrés différents, chez les 4 animaux.

La quantité de colitoxine passée dans la circulation générale a donc été suffisante pour provoquer la réaction hémorragique dans les capillaires vasculaires bien imprégnés de filtrat préparant, même lorsque la déchaînante a été faite par voie hypodermique. Nous sommes arrivé au même résultat, nous allons le voir, en employant les cultures vivantes [37] ou tuées [38] au lieu de filtrat, et cela sans utiliser la préparation vasculaire locale.

Réaction de Shwartzman par voie sous-cutanée et intramusculaire à l'aide de cultures microbiennes.

Nous venons de voir que l'injection déchaînante peut être effectuée par la voie sous-cutanée si la préparation locale a été particulièrement sévère. Dès lors, il paraissait légitime de réaliser cette préparation locale au moyen de cultures microbiennes, celles-ci continuant à déverser sur place les produits toxiques qu'elles élaborent.

Expérience 1. — A 2 lapins adultes de 1.700 grammes environ, nous injectons, dans le derme du flanc droit, 0 c. c. 3 d'une culture de *B. coli* V en bouillon, âgée de vingt-quatre heures. Après une vingtaine

d'heures, nous injectons, sous la peau de la cuisse gauche, 3 cent cubes de filtrat de bacille de Morgan 14, provenant d'une culture en bouillon de six jours. Après huit heures, nous constatons que, chez l'un des animaux, la réaction de Shwartzman est fortement prononcée ; la tache hémorragique, située au niveau de l'injection préparante, mesure de 4 à 5 centimètres de diamètre. Chez l'autre, la tache est érythémateuse, avec le léger œdème caractéristique de la zone préparée, mais sans lésion hémorragique.

Expérience 2 — A 6 lapins de 1.400 à 1.500 grammes, nous injectons, dans le derme du flanc gauche, 0 c. c. 3 de culture de bacille de Morgan en bouillon de quarante-huit heures et, vingt-quatre heures plus tard, sous la peau de la cuisse droite, 3 cent. cubes de filtrat de culture de *B. coli* V en bouillon, âgée de six jours. De nombreux points purpuriques apparaissent, à l'endroit de la première injection, chez un des animaux après trois heures, chez un autre après cinq heures. Le lendemain, chez ces 2 lapins, la réaction se montre sous forme de larges nappes hémorragiques. Les 4 autres lapins n'ont pas réagi.

Expérience 3. — A 4 lapins de poids sensiblement égal (1.400 grammes), nous injectons, dans la peau du flanc, 0 c. c. 3 de culture de *B. coli* V. Quatorze heures plus tard, nous pratiquons, dans les muscles fessiers, l'injection déchaînante à raison de 2 cent. cubes de filtrat de bacille de Morgan. Après sept heures, la réaction hémorragique est fortement positive chez 1 lapin, faible chez 1 autre, tandis qu'elle est négative chez les 2 derniers.

Pareilles expériences, répétées plusieurs fois, nous ont donné des résultats analogues, avec une régularité surprenante. Il va sans dire que les témoins éprouvés par de simples injections aux mêmes doses, dermiques chez les uns, hypodermiques ou intra-musculaires chez les autres, n'ont présenté, dans aucun cas, de lésions hémorragiques visibles. Les seuls symptômes sont des inflammations locales banales, avec infiltrations œdémateuses, qui disparaissent d'ailleurs en deux ou trois jours, en laissant, le plus souvent, de petits abcès qui guérissent assez rapidement.

De ces faits, il apparaît que, lorsque l'injection préparante est effectuée avec une culture, l'état de préparation locale est plus accentué ; peut-être sa tendance à la guérison est-elle moins marquée. Ceci expliquerait que les quantités de toxine entraînées par la circulation, après l'injection sous-cutanée ou intramusculaire, sont suffisantes pour déterminer la dislocation de la paroi endothéliale des capillaires, quoique ces quantités

soient beaucoup plus faibles que celles apportées plus brutalement par l'injection intraveineuse. Toutefois, on aurait pu s'attendre à une proportion de résultats positifs plus élevée, car la production de toxine pendant plusieurs heures à l'endroit préparé devait, semble-t-il, dans tous les cas, déterminer un état de préparation plus sévère.

Or, si l'on répète les mêmes expériences sur 16 lapins, en substituant aux cultures vivantes de colibacille ou de bacille de Morgan des cultures tuées par un chauffage d'une heure à 60°, on obtient des résultats qui ne le cèdent en rien aux précédents puisque 8 lapins donnent des réactions hémorragiques caractéristiques.

Il est superflu d'ajouter que les témoins inoculés une seule fois par voie dermique, hypodermique ou musculaire, aux mêmes doses, avec les cultures tuées, n'ont présenté que de l'érythème avec infiltration inflammatoire.

Le problème est donc plus complexe que nous ne l'avions supposé au premier abord et l'on devait se demander si l'endotoxine de germes tels que le colibacille et le bacille de Morgan ne jouent pas un rôle prépondérant dans les deux phases du phénomène hémorragique.

La réaction de Shwartzman et les endotoxines microbiennes.

Pour élucider ce point, il était nécessaire de refaire ces expériences avec des endotoxines. Nous avons utilisé [39] l'endotoxine du bacille de Morgan, préparée suivant le procédé de Boivin et Mesrobeanu [40].

Expérience 1. — Nous préparons 6 lapins de même poids (1.500 grammes) en leur injectant, dans le derme du flanc, 0 c. c. 5 de la dilution au 1/10 d'endotoxine de bacille de Morgan. Après un intervalle de vingt-quatre heures, nous leur injectons, sous la peau de la cuisse, la même endotoxine, diluée au 1/10, à raison de 1 cent. cube par kilogramme d'animal. Au bout de trois à sept heures, nous voyons se développer, à l'endroit de l'injection dermique, une réaction hémorragique de Shwartzman, fortement prononcée chez 4 lapins, moins marquée chez le cinquième, nulle chez le sixième.

Expérience 2. — Nous préparons 6 autres lapins de poids variable (1.500 à 2.000 grammes) et nous leur injectons, dans le derme du flanc, la même endotoxine diluée au 1/10 à la dose de 0 c. c. 5.

Vingt-quatre heures plus tard, nous inoculons, dans les muscles de la cuisse, 1 cent. cube de la solution d'endotoxine par kilogramme d'animal. Quelques heures plus tard, nous trouvons une forte réaction hémorragique chez 3 lapins, moins forte chez les 2 suivants ; le dernier n'a manifesté qu'une simple rougeur.

Expérience 3. — Enfin, dans une autre série de 8 lapins de poids sensiblement égal 1.550 à 1.600 grammes), nous injectons, dans le derme de la cuisse, 0 c. c. 5 d'endotoxine, comme pour les expériences précédentes. Après vingt-quatre heures, nous pratiquons l'injection déchaînante hypodermique, non plus avec l'endotoxine, mais avec un filtrat de bacille de Morgan, provenant d'une culture de six jours en bouillon, à la dose de 3 cent. cubes par animal. Cinq heures plus tard, 3 des lapins avaient déjà réagi classiquement et, le lendemain, 2 nouveaux lapins manifestaient aussi des réactions hémorragiques typiques. Les 3 autres lapins n'ont pas réagi.

Ces trois types d'expériences, répétées plusieurs fois, nous ont donné des résultats analogues.

De ces observations, on peut conclure que l'endotoxine est capable de préparer et de déclencher le phénomène hémorragique. Mais, et ceci la différencie des filtrats généralement utilisés, elle peut déclencher par voie sous-cutanée et intraveineuse. C'est vraisemblablement par elle que les cultures vivantes ou tuées peuvent engendrer les réactions hémorragiques que nous avons observées dans nos expériences précédentes. Il n'est pas douteux que leur aptitude à amorcer la lésion capillaire est particulièrement développée, car la proportion de résultats positifs (15 sur 20) est sensiblement plus élevée que dans les essais pratiqués avec les filtrats de cultures en bouillon.

Les toxines microbiennes et leur rôle dans les phénomènes hémorragiques.

Avant d'exposer les recherches ayant pour but de comparer l'action des endotoxines et celle des exotoxines dans les phénomènes hémorragiques, nous croyons qu'il n'est pas inutile de rappeler quelques notions. Certaines d'entre elles, déjà anciennes, sont devenues classiques ; d'autres résultent d'acquisitions récentes.

Les exotoxines sont des substances qui diffusent rapidement hors du corps microbien ; pour les obtenir, on filtre, sur bougie de porcelaine, soit une culture en bouillon, soit l'émulsion

en bouillon (ou en eau physiologique) d'une culture sur gélose.

Les endotoxines, au contraire, demeurent fixées dans les corps bactériens, aussi longtemps que ceux-ci restent intacts. Pour obtenir les endotoxines en solution, il faut désorganiser les cellules microbiennes en les soumettant à un broyage minutieux, ou bien en leur faisant subir une série de manipulations chimiques ou physiques ou, enfin, en les abandonnant à l'autolyse prolongée.

La nature chimique des exotoxines est encore, à l'heure actuelle, en pleine étude. Ces substances, jusqu'à présent, ne paraissent pas avoir été obtenues à l'état absolument pur. On peut précipiter l'exotoxine par l'action de divers sels métalliques ou de divers acides et la séparer de la grande majorité des matières inactives du filtrat exotoxique. On obtient de la sorte des préparations qui donnent nettement les réactions des albumines et qui représentent, semble-t-il, le principe actif en question. A en juger par le fait qu'elles ne dialysent que très difficilement, qu'elles sont précipitées comme des protéines par les réactifs chimiques et qu'elles sont plus ou moins détruites par les diastases protéolytiques, on est donc en droit de penser, et c'est l'opinion généralement admise, que les exotoxines sont des protéines.

Quant à la constitution chimique des endotoxines, les renseignements, jusqu'à ces toutes dernières années, étaient extrêmement rares et, dans l'ignorance totale où l'on était, on leur attribuait également une nature protéique.

Mais, depuis les remarquables travaux de Boivin et de Mesrobeanu [**41**], de Raistrick et Topley [**42**], de Delafield [**43**], de Martin [**44**], pour ne citer que les plus importants, la nature des endotoxines s'est considérablement précisée.

C'est à Boivin et Mesrobeanu que revient le grand mérite d'avoir, les premiers, dès 1933, isolé du bacille d'Aertrycke l'endotoxine à l'état le plus voisin possible de la pureté chimique ; ils ont montré, en outre, qu'elle n'a aucun rapport de structure avec les protéines et qu'elle est, par conséquent, totalement différente de l'exotoxine. L'endotoxine est, tout au moins chez les bactéries à Gram négatif, un complexe glucido-lipidique résultant essentiellement de l'union d'un polysaccharide avec des acides gras.

Peu de temps après, en 1934, Raistrick et Topley, utilisant une technique différente, ont isolé du même germe une substance dont la structure chimique et les propriétés biologiques sont identiques à celles de l'endotoxine de Boivin et Mesrobeanu.

Depuis 1933, Boivin et ses collaborateurs ont pu extraire des endotoxines glucido-lipidiques de nombreuses autres bactéries : les bacilles typhiques, paratyphiques, dysentériques, le vibrion cholérique, etc. Leur technique d'extraction par l'acide trichloracétique est devenue classique en raison de sa simplicité et de la régularité des résultats qu'elle donne. C'est ainsi que Huddleson et Pennell [45] (États-Unis) et Lisbonne et Monnier [46] (France) ont appliqué la méthode aux *Brucella*. Nous-même l'avons utilisée pour préparer l'endotoxine du bacille de Morgan. Le lecteur désireux de plus amples détails trouvera, dans le récent Traité de Bactériologie et Immunologie de Topley et Wilson [47] et dans les travaux originaux de Boivin et Mesrobeanu [48] un historique complet et un exposé de la question des toxines bactériennes qui alourdirait inutilement cette étude.

Nous nous bornerons à indiquer brièvement les éléments fondamentaux de la technique.

Les bactéries sont cultivées sur gélose pendant vingt à vingt-quatre heures à 37°. On les recueille en lavant la culture à l'eau physiologique ; on les sépare par centrifugation à grande vitesse et on les lave, à deux ou trois reprises, par de nouvelles centrifugations, soit avec de l'eau physiologique, soit avec de l'eau distillée. On obtient une purée bactérienne dont on évalue le poids et qu'on émulsionne dans l'eau, de telle sorte que 1 cent. cube de suspension renferme une quantité connue de microbes frais (usuellemnt 200 milligrammes). On double le volume de cette suspension avec l'acide trichloracétique demi-normal, on agite et on laisse en contact pendant environ trois heures à la glacière. Puis on centrifuge à grande vitesse, pour se débarrasser des cadavres bactériens qui ont été fixés par les réactifs déprotéinisants, et on obtient un extrait trichloracétique qu'on dialyse pendant quarante-huit heures contre un courant d'eau ordinaire. La dialyse est poursuivie pendant vingt-quatre heures encore, contre un grand volume d'eau distillée. On recueille le contenu des sacs à dialyse, qui se présente sous l'aspect d'une solution d'autant plus opalescente que la richesse en endotoxine est plus grande. Les endotoxines ainsi obtenues sont filtrées à travers une bougie L 3 et sont alors prêtes pour l'emploi.

Quant aux exotoxines, Boivin [49] est arrivé, dès 1936, à les séparer également des filtrats de cultures.

Le principe de la méthode est le suivant : l'acide trichloracétique permet de séparer aisément les endotoxines des protéines bacillaires : sous son action, l'endotoxine passe en solution, tandis que les protéines des corps bacillaires sont précipitées.

L'exotoxine, en tant que protéine, est entraînée dans le même précipité. De ce fait, le même réactif permet donc de purifier les exotoxines en les séparant des endotoxines éventuellement présentes dans les filtrats et des substances étrangères du bouillon de culture.

Technique. — On détermine d'abord le volume d'acide trichloracétique normal qu'il faut ajouter à 10 cent. cubes de filtrat en expérience, pour amener le pH vers 3,5 et pour déclencher l'apparition d'un précipité se déposant bien par centrifugation. L'opération est alors pratiquée sur la totalité du filtrat d'après les données de l'essai préliminaire. On agite un instant et on laisse au repos pendant une dizaine de minutes. On centrifuge à grande vitesse, puis on rejette le liquide qui surnage. On dissout aussitôt le précipité à froid dans un petit volume de solution alcaline. La solution obtenue est ramenée au volume primitif du filtrat par adjonction d'eau physiologique et on filtre sur bougie L 3.

On sait que Shwartzman utilisa pour ses recherches des filtrats contenant l'exotoxine et provenant soit de cultures de six jours en bouillon, soit de cultures de vingt-quatre heures sur gélose.

C'est d'ailleurs la conviction de Shwartzman lui-même, et c'est pour cette raison qu'il conclut que le principe actif du filtrat doit être une exotoxine.

Au contraire, pour F. Burnet, ce sont les filtrats de vieilles cultures en bouillon qui donnent les réactions hémorragiques les plus marquées. Pour lui, le principe actif est une endotoxine. Il base son argument sur le fait que l'endotoxine typhique, préparée par la méthode de Besredka, donne des hémorragies plus intenses si on les compare avec celles qu'on obtient avec des filtrats ordinaires.

Gratia et Linz ont pu vérifier, en utilisant la même méthode d'extraction, la grande activité de l'endotoxine de *B. coli* V et confirmer l'opinion de Burnet.

Shwartzman, tout en reconnaissant l'effet hémorragique de l'endotoxine, ne lui a pas attribué de supériorité et a estimé qu'il pouvait se contenter de l'exotoxine pour poursuivre ses expériences.

Or, les expériences que nous avons effectuées, à l'aide des cultures vivantes et tuées, nous ont donné l'occasion d'entrevoir l'importance particulière de l'action de l'endotoxine dans la production des réactions hémorragiques et nous avons vu qu'elle possédait, à un très haut degré, l'aptitude à préparer le phénomène de Shwartzman.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de refaire les expériences les plus importantes dans le but, cette fois, de mettre en parallèle les résultats obtenus par l'emploi de l'exotoxine et de l'endotoxine, la concentration de celles-ci étant calculée d'après le poids des corps microbiens des cultures d'origine.

Nous avons d'abord comparé l'effet déclenchant de l'endo- et de l'exotoxine de Boivin, introduites par voie hypodermique et musculaire, chez les lapins préparés par injection intradermique avec les toxines correspondantes. Nous avons observé que seuls les lapins préparés et déclenchés par l'endotoxine donnent une réaction hémorragique constante. Par contre, les lapins préparés et déclenchés par l'exotoxine ne réagissent pas.

Expérience 1. — On ensemence, de bacille de Morgan 14, 2 boîtes de Roux contenant de la gélose. Après vingt heures d'incubation, on recueille la culture et on procède à l'extraction de l'endotoxine par l'acide trichloracétique. On dialyse l'extrait et on le filtre sur bougie. Le filtrat obtenu est ensuite dilué dans 200 cent. cubes d'eau physiologique.

A un lot de 4 lapins, nous injectons, dans la peau du flanc, 0 c. c. 5 de cette endotoxine. Après vingt-quatre heures, nous injectons le même produit à la dose de 2 cent. cubes. 2 de ces lapins reçoivent l'injection sous la peau de la cuisse, 2 autres dans les muscles. Au bout de quelques heures, les 4 animaux ont présenté la réaction hémorragique à la peau du flanc préparée par la première injection.

Expérience 2. — On ensemence un ballon contenant 200 cent. cubes de bouillon avec le même germe qui a servi pour la première expérience. Après incubation de six jours, on filtre la culture et on procède à l'extraction de l'exotoxine par l'acide trichloracétique. On obtient un précipité qu'on dissout ensuite dans 200 cent. cubes d'eau physiologique.

A un lot de 6 lapins, nous injectons 0 c. c. 5 de cette exotoxine

dans la peau du flanc. Vingt-quatre heures après, à 2 des lapins, nous injectons 2 cent. cubes d'exotoxine sous la peau de la cuisse, à 2 autres dans les muscles, et à 2 autres dans les veines. Déjà, après trois heures, ces 2 derniers ont présenté une forte réaction hémorragique à l'endroit de l'injection préparante. Les 4 premiers, qui avaient reçu l'injection déchaînante sous la peau et dans les muscles, n'ont pas réagi ni le jour même, ni les jours suivants.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons combiné de plusieurs manières la préparation et le déclenchement avec les deux espèces de toxines.

Nous avons constaté, en outre, que la réaction hémorragique peut être déclenchée avec l'exotoxine par voie hypodermique et musculaire, si la préparante a été faite avec l'endotoxine, et qu'on peut déclencher avec l'endotoxine par les mêmes voies, si l'injection préparante a été faite avec l'exotoxine.

Voici un des protocoles de ces expériences :

Expérience 3. — A un lot de 12 lapins, nous injectons, dans la peau du flanc, 0 c. c. 5 d'endotoxine. Après vingt-quatre heures, nous injectons à 6 lapins 2 cent. cubes d'exotoxine sous la peau de la cuisse, et, à 6 autres, la même dose dans les muscles de la cuisse. Le lendemain, dans le premier groupe, nous constatons une réaction hémorragique prononcée chez 3 lapins. Dans le second groupe, 2 seulement ont présenté la réaction. 7 lapins n'ont pas réagi.

Expérience 4. — A un nouveau lot de 12 lapins, nous injectons, dans la peau du flanc, 0 c. c. 5 d'exotoxine. Après vingt-quatre heures, nous déclenchons avec 2 cent. cubes d'endotoxine, chez 6 lapins par voie hypodermique, chez 6 autres par voie musculaire. Le lendemain, 5 lapins du premier groupe et 3 du second groupe ont présenté la réaction hémorragique. 4 sont restés indemnes.

On a donc l'impression que l'endotoxine exerce, sur l'endothélium des capillaires, une action plus profonde que l'exotoxine puisque, d'une part, la lésion préparée par elle est sensible aux faibles quantités d'exotoxine qui passent dans la circulation à la suite des injections sous-cutanées ou intramusculaires, et que, d'autre part, l'endotoxine introduite par ces mêmes voies est capable de déclencher l'hémorragie à l'endroit préparé par l'exotoxine. Si l'on pratique simultanément deux injections préparantes, une avec l'endotoxine et l'autre avec l'exotoxine, comment apparaîtra la réaction après injection déchaînante d'endo ou d'exotoxine par voie hypodermique ou musculaire ?

EXPÉRIENCE 5. — A 5 lapins, nous injectons, dans la peau du flanc, 1 cent. cube d'endotoxine du côté droit et 1 cent. cube d'exotoxine du côté gauche. Après vingt-quatre heures, nous pratiquons l'injection déchaînante, en introduisant, sous la peau de la cuisse, 3 cent. cubes d'endotoxine. Cinq heures plus tard, nous constatons que 2 des lapins présentent déjà une réaction hémorragique prononcée du côté préparé à l'endotoxine. Le lendemain, 2 autres lapins ont réagi à leur tour. Mais, de plus, 1 des lapins qui présentait la veille la réaction du côté endotoxine la présente maintenant aussi du côté exotoxine. Le cinquième n'a manifesté que de la congestion inflammatoire locale, avec œdème considérable, sans hémorragie.

EXPÉRIENCE 6. — Enfin, à 4 lapins, nous pratiquons les mêmes injections préparantes que précédemment. Mais, après vingt-quatre heures, nous injectons, sous la peau de la cuisse, 3 cent. cubes d'exotoxine au lieu d'endotoxine. Sept heures plus tard, on trouve déjà l'hémorragie, sur le côté préparé avec l'endotoxine, chez 1 des lapins. Le lendemain, un deuxième lapin présente la réaction du même côté. Les 2 autres manifestent la réaction de Shwartzman typique, des deux côtés à la fois.

Il ne faut pas oublier que, dans ces expériences, l'introduction simultanée d'endotoxine et d'exotoxine, quoique effectuée en deux régions séparées, sera suivie d'une résorption qui amènera fatalement de l'endotoxine au niveau de la peau préparée par l'exotoxine et réciproquement.

Il n'en est pas moins évident que l'endotoxine active à la fois l'action préparante et l'action déchaînante de l'exotoxine, en ce sens qu'elle détermine ou qu'elle accentue des phénomènes hémorragiques que l'exotoxine seule est impuissante à déclencher par les voies cutanée et musculaire, comme nous l'avons vu plus haut.

En voici encore un exemple démonstratif :

EXPÉRIENCE 7. — Nous préparons 2 lapins en leur injectant, dans la peau de la cuisse gauche, 1 cent. cube d'exotoxine. Après vingt-quatre heures, nous injectons, sous la peau du ventre, 2 cent. cubes de la même exotoxine. Au bout de vingt-quatre heures, la réaction ne s'est pas produite. On pratique alors une injection de 2 cent. cubes d'endotoxine sous la peau du dos, loin des deux premières injections. Six heures plus tard, une réaction considérable apparaît à l'endroit de la première injection déchaînante pratiquée avec l'exotoxine. Elle envahit tout le tissu dermique de la paroi abdominale et le péritoine pariétal. De plus, une petite réaction locale se voit à l'endroit de la première injection préparante qui, datant de quarante-huit heures, a déjà subi un commencement de réparation.

En somme, toute cette dernière série d'expériences concourt à démontrer que l'on peut reproduire, avec l'endotoxine et l'exotoxine, toutes les constatations déjà faites auparavant avec les cultures et leurs filtrats. Mais elles offrent le grand avantage de constituer un matériel expérimental très voisin de la pureté chimique et de permettre, par conséquent, des interprétations plus précises.

En conclusion, le principe actif de la réaction de Shwartzman n'est pas encore isolé, si tant est qu'il soit isolable.

Nous avons montré qu'il doit être contenu dans les cultures vivantes, les cultures tuées, les filtrats qui ont servi de base aux premières recherches.

Puis, nous nous sommes efforcé de rétrécir le champ d'investigation en montrant que, dans ces cultures et ces filtrats, la partie seule active est l'endo- et l'exotoxine, isolées et purifiées grâce à la méthode de Boivin et Mesrobeanu, et nous avons vu que l'activité de l'endotoxine est beaucoup plus développée que celle de l'exotoxine.

L'endotoxine et l'exotoxine sont-elles, comme nous le pensons, les principes actifs de Sanarelli-Shwartzman, ou bien toutes deux renferment-elles une substance distincte, le principe actif, non encore isolé ? C'est ce que nous espérons pouvoir résoudre au cours de recherches ultérieures.

Etude histologique des lésions provoquées par le phénomène de Sanarelli-Shwartzman.

Nous n'avons pas la prétention d'avoir effectué une étude histologique approfondie des lésions que l'on observe au cours du phénomène de Sanarelli-Shwartzman ; elle n'est pas de notre compétence ; cependant, il nous semble que les observations sommaires que nous avons pu faire grâce à l'aide amicale de M. M. Herlant et de M^lle^ E. Claes, apportent quelques éclaircissements au mécanisme des phénomènes hémorragiques et peuvent constituer une base de départ pour de nouvelles recherches.

Ces examens histologiques ont porté sur la peau des animaux soumis à des injections préparantes, sur la peau de ceux qui ont subi des injections déchaînantes et aussi, dans

ces derniers cas, sur des organes viscéraux, le poumon, le foie, le rein et les capsules surrénales.

Nous ne décrirons ici que les lésions histologiques élémentaires que nous avons été à même de constater.

I. — *Injections préparantes.*

Nous avons examiné des fragments de peau prélevés au voisinage du lieu d'inoculation du filtrat microbien, quatre heures, huit heures, seize heures et soixante-douze heures après l'injection.

Quatre heures après l'injection, le derme présente un œdème considérable qui dissocie les fibres élastiques. A ce stade, les modifications vasculaires sont faibles, les capillaires sont légèrement dilatés, quelques polynucléaires infiltrent le derme.

Des thromboses apparaissent déjà dans les veines profondes du derme. La paroi interne de la veine est entièrement tapissée de polynucléaires, certains d'entre eux s'insinuent entre les tuniques de la veine.

Neuf heures après l'injection, l'œdème est intense, les capillaires se dilatent davantage, leur endothélium est tapissé de polynucléaires. Ces derniers infiltrent le derme en grand nombre. Les éosinophiles prédominent.

Seize heures après l'injection, les capillaires veineux et les veinules sont distendus. L'infiltration inflammatoire est toujours très marquée ; elle est uniquement composée de polynucléaires.

On voit la formation très nette de thrombi granuleux au niveau de certaines veines. Ces thrombi s'attachent fortement à la paroi de la veine.

Soixante-douze heures après l'injection, l'œdème a pris fin. Il n'y a plus de dissociation du derme qui est revenu sur lui-même.

Les capillaires veineux ont repris un calibre normal sans que l'on puisse distinguer des lésions des cellules endothéliales par les méthodes histologiques ordinaires que nous avons employées. Certaines cellules endothéliales sont recouvertes de granulations et en contiennent même dans leur cytoplasme.

On trouve également dans ces vaisseaux des cellules monocytaires qui contiennent des inclusions dont nous ne pouvons préciser la nature. Jamais, à ce stade, nous n'avons surpris de mitoses qui puissent nous faire songer à des phénomènes de régénération au niveau de l'endothélium.

L'infiltration inflammatoire s'est ramassée dans la profondeur du derme où elle est en voie de nécrose. Entre les faisceaux du derme, on voit apparaître des nuées de monocytes.

Les thromboses persistent toujours au niveau de certains troncs veineux.

Contrairement aux capillaires veineux de petit calibre, ces troncs veineux contiennent des globules rouges en abondance, qui sont retenus dans les mailles des thrombus.

A la suite d'une injection préparante, on assiste à une très forte hyperémie passive du derme : jamais, au cours de ces expériences, on ne voit d'extravasations de globules rouges, si minimes soient-elles, et les capillaires sont toujours modérément remplis d'hématies.

II. — *Injections déchaînantes.*

Peau. — Des fragments de peau ont été prélevés cinq heures après l'apparition de la réaction hémorragique, au niveau de l'oreille et au niveau de la peau du flanc.

A. *Peau de l'oreille.* — La vasodilatation passive est très marquée. Les veinules et les capillaires veineux sont très fortement dilatés. Ils sont remplis de globules rouges cette fois et cette condition permet de les différencier de l'état qu'ils offraient à la suite de la réaction préparatoire. De plus, on distingue, en de nombreux endroits, des extravasations sanguines, plus ou moins importantes dans le derme.

De nombreux polynucléaires franchissent l'endothélium et se répandent dans les cloisons.

L'endothélium de ces capillaires est aplati et nous n'avons relevé aucune lésion pathologique à ce niveau.

Les capillaires artériels sont sans particularité.

B. *Peau du flanc.* — Les phénomènes sont identiques.

L'œdème et la congestion passive sont considérables. On constate la présence de nombreuses extravasations sanguines autour des vaisseaux de petit calibre et une importante diapédèse de polynucléaires.

Nous n'avons pas observé davantage de modifications des endothéliums.

En coupe tangentielle, on voit nettement les extravasations sanguines autour de chaque peloton vasculaire des papilles du derme et l'on voit également que la distension et les extravasations se font aux dépens des zones veineuses du peloton glomérulaire.

En résumé, le phénomène nouveau est constaté par l'apport de très nombreux globules rouges et leur extravasation aux dépens des vaisseaux de petit calibre dans le derme environnant. L'aspect est identique au niveau de la région injectée et à distance. L'infiltration des cellules inflammatoires est très comparable à celle que nous avons observée à la suite de la réaction préparante cutanée.

Pour saisir histologiquement le moment précis où, à la suite des injections déchaînantes, apparaissent des hémorragies, nous avons prélevé des fragments de peau une heure, deux heures, trois heures, quatre heures, cinq heures et vingt-quatre heures après la réaction déchaînante.

Ces injections ont été pratiquées vingt-quatre heures après la préparante et suivant la méthode de Shwartzman, les unes avec du filtrat de *B. coli*, les autres avec du filtrat de Morgan.

Une heure après, on n'aperçoit pas encore d'extravasations sanguines ; les capillaires veineux sont dilatés et gorgés de globules rouges ; on remarque une très forte infiltration inflammatoire à polynucléaires, avec prédominance d'éosinophiles en tous points semblable à celle que provoque l'injection préparante. Elle ne résulte donc pas de l'injection déchaînante.

Deux heures après, se manifestent les premières extravasations sanguines, elles sont encore discrètes, elles apparaissent sous l'aspect de petits amas d'hématies qui se répandent dans le stroma prévasculaire.

A la troisième heure, les extravasations sont à peine plus prononcées, elles ne s'accusent nettement qu'à la quatrième et cinquième heure, suivant l'injection. A ce moment, des nappes

de globules rouges envahissent le derme, principalement au niveau des papilles dermiques.

Les extravasations semblent prendre naissance en premier lieu, aux dépens des capillaires moyens.

Vingt-quatre heures après l'injection déchaînante, les hémorragies sont acquises et les images histologiques sont comparables à celles décrites précédemment.

A mesure que les extravasations s'accroissent, l'infiltration inflammatoire diminue, elle est moins intense vingt-quatre heures après l'injection déchaînante que huit heures après l'injection préparante.

A tous ces stades, nous avons observé des thrombi au niveau des veines profondes du derme. Ils présentent les mêmes caractères histologiques que ceux que nous avons observés à la suite des injections préparantes. Au centre du thrombus, on note la présence de nombreux polynucléaires en voie de destruction. Ils sont donc, selon toute vraisemblance, le résultat de l'injection préparante.

En résumé, les extravasations sanguines font leur apparition deux heures après une injection déchaînante, mais ne deviennent importantes que quatre à cinq heures après cette injection.

Les infiltrations inflammatoires à polynucléaires que l'on constate au niveau du derme après l'injection déchaînante, préexistent à cette injection et se produisent à la suite de la préparante.

Examen histologique des organes viscéraux.

Cette étude a porté sur les ganglions lymphatiques, les poumons, le rein et les capsules surrénales.

Nous ferons, à la suite de la description des lésions de ces divers organes, une mention toute particulière des altérations que nous avons constatées au niveau du foie et qui nous ont paru présenter un grand intérêt.

Tous ces organes ont été prélevés cinq à six heures après la réaction déchaînante, soit au moment où le phénomène hémorragique était bien reconnaissable microscopiquement.

Ganglions. — Lorsque nous avons pratiqué une injection préparante au niveau de la cuisse, nous avons prélevé les ganglions fessiers après le déclenchement du phénomène par voie veineuse.

Lorsque la réaction est positive, les ganglions sont hypertrophiés ; ils présentent microscopiquement une forte hyperémie et même des suffusions hémorragiques.

Nous avons, de plus, prélevé des ganglions viscéraux lorsqu'ils nous sont apparus hyperémiés et hémorragiques, soit après un Shwartzman, soit après un Sanarelli.

Quel que soit le siège du prélèvement, on observe, à faible grossissement, que l'hypertrophie que l'on constate macroscopiquement, est due non point à une hyperplasie et à une multiplication des centres germinatifs, mais bien à une dilatation considérable des sinus et particulièrement des sinus médullaires. Ces sinus sont béants, ils contiennent une quantité modérée de globules rouges libres, mais un très grand nombre de monocytes de très grande taille, entièrement bourrés d'hématies en voie de lyse. Les cellules réticulaires elles-mêmes ont également phagocyté des hématies.

La zone corticale est refoulée à la périphérie. Elle est mince et les follicules sont difficiles à distinguer les uns des autres. Les centres germinatifs ne présentent jamais de signes d'hyperactivité, bien au contraire, ils semblent le plus souvent atrophiés et on constate à ce stade des phénomènes de pycnose lymphocytaire très nets.

Les cordons médullaires apparaissent également rétrécis et l'on voit peu de lymphocytes libres dans les sinus.

Les vaisseaux sanguins qui alimentent les ganglions sont en état de vasodilatation très marquée et les lymphatiques lobaires sont béants et gorgés de lymphe, mais ils ne contiennent pas d'éléments circulants.

Poumons. — A faible grossissement, on reconnaît des hémorragies abondantes, un œdème considérable et une vasodilatation de tous les capillaires des parois alvéolaires.

Les hémorragies envahissent tantôt un petit nombre d'alvéoles, tantôt un territoire pulmonaire, et c'est autour des grandes nappes sanguines que l'on observe les zones d'œdème.

Ces hémorragies n'ont toutefois pas un caractère systématisé ou lobulaire.

Les infiltrations inflammatoires sont très discrètes ou inexistantes.

A fort grossissement, on voit nettement que la paroi des alvéoles est tuméfiée et dans les zones où l'hémorragie est peu importante, on suit parfaitement le sort des capillaires de ces parois.

Ils sont dilatés et gorgés d'hématies ; en de nombreux endroits de la paroi alvéolaire, on les voit très distinctement faire hernie dans la cavité alvéolaire. En d'autres points, ces petites poches gorgées d'hématies se rompent nettement à leur extrémité, car on distingue leurs parois qui s'écartent l'une de l'autre et les globules rouges qui sont déversés dans la cavité alvéolaire.

Mais il est vraisemblable qu'il y a, d'autre part, des phénomènes de diapédèse globulaire, car on remarque la présence de capillaires formant une hernie dilatée mais vide de sang et l'on observe des amas d'hématies accolés à leur paroi extérieure.

Dans les zones où l'hémorragie est très abondante, les parois alvéolaires ont été secondairement disloquées et les phénomènes que nous venons de décrire sont beaucoup moins reconnaissables.

Le flot des hématies envahit la plupart des bronches dont la lumière est encombrée de globules rouges partiellement hémolysés.

En résumé, les hémorragies sont particulièrement abondantes au niveau du poumon. Ce phénomène est aisé à comprendre si l'on considère la fragilité des capillaires des parois alvéolaires

C'est au niveau de cet organe, uniquement, et là où les hémorragies étaient discrètes, que nous pouvons affirmer avoir observé des ruptures capillaires et cela grâce au fait exceptionnel que ces capillaires distendus faisaient hernie dans un espace vide constitué par la cavité alvéolaire.

FOIE. — *Injection préparante.* Nous avons observé des foies d'animaux soumis à des injections préparantes, soit par la

méthode de Shwartzman, soit par la méthode de Sanarelli, et à des injections déchaînantes.

Nous avons observé, au niveau du foie, les mêmes lésions de nécrose qu'après l'injection déchaînante ; elles révèlent une altération profonde du parenchyme hépatique.

Vingt-quatre heures après une injection préparante de Sanarelli, on peut déjà en constater de très importantes.

Elles débutent au voisinage de la veine intra-lobulaire et gagnent, de proche en proche, la presque totalité du lobule dans certaines zones. Toutefois, au voisinage des espaces portes, il reste des régions intactes.

La paroi des veines intra-lobulaires est intacte, leurs cellules endothéliales sont aplaties, elles sont dilatées et gorgées d'hématies, elles contiennent également de nombreux éosinophiles.

Les sinusoïdes présentent une dilatation considérable, même dans les zones encore intactes, mais les hématies augmentent à mesure qu'on se rapproche de la veine centro-lobulaire et ils ne sont gorgés de sang qu'au voisinage immédiat de cette veine.

Bien qu'au niveau des zones nécrotiques, leurs limites sont difficiles à distinguer; il n'existe pas de nappes sanguines comparables, par exemple, à celles que l'on observe dans la stase hépatique d'origine cardiaque.

Dans les zones nécrotiques, il existe de plus une infiltration inflammatoire à polynucléaires très abondante et, parmi ceux-ci, les éosinophiles prédominent.

La nécrose des éléments hépatiques est caractérisée par l'atrophie des cellules, leur forme irrégulière, leur affinité éosinophile, la perte de colorabilité du noyau et du cytoplasme.

Lorsque l'on suit une même travée, on voit brusquement réapparaître des cellules normales.

Injection déchaînante. Nous avons examiné le foie de nombreux animaux ayant subi une injection déchaînante.

Dans tous les cas, nous avons observé des nécroses identiques à celles que nous avons décrites après l'injection préparante intraveineuse.

Elles sont plus ou moins importantes, suivant le cas, mais se rencontrent également au voisinage des veines centro-lobu-

laires. Elles s'accompagnent de dilatation et de réplétions hématiques des sinusoïdes.

Les altérations du parenchyme sont plus marquées, les cellules hépatiques dans les zones nécrotiques sont à peine reconnaissables.

L'infiltration inflammatoire peut être plus abondante, mais ce n'est pas une règle absolue. Elle présente les mêmes caractères avec une prédominance de polynucléaires éosinophiles.

Dans un cas, nous avons observé de véritables thromboses fibrineuses des troncs principaux des veines sous-hépatiques fortement infiltrées de polynucléaires qui formaient par place des amas en voie de nécrose.

En résumé : après l'injection préparante, suivant la méthode de Sanarelli et après l'injection déchaînante, on observe régulièrement, au niveau du foie, des lésions qui se caractérisent par des nécroses disséminées. Ces nécroses s'observent au voisinage des veines centro-lobulaires et respectent les zones voisines des espaces portes.

Nous n'avons rencontré que dans un cas des thromboses des troncs importants des veines centro-lobulaires ; encore, dans ce cas, les veines, au centre des régions nécrotiques, étaient-elles dilatées et remplies d'hématies, mais non thrombosées. Nous ne pouvons donc conclure que les nécroses du parenchyme hépatique soient dues à un phénomène thrombotique. Elles sont très profondes et s'accompagnent de dégénérescence complète du parenchyme hépatique. Cependant, si à ce niveau les sinusoïdes sont dilatés et gorgés de sang, les globules rouges ne s'évadent pas pour former des lacs sanguins.

Ces phénomènes de nécrose s'accompagnent toujours d'une forte infiltration inflammatoire où prédominent les polynucléaires éosinophiles.

Nous ne sommes pas parvenu à démontrer qu'il y ait un rapport de cause à effet, entre l'apparition des nécroses et l'apparition des phénomènes hémorragiques.

Reins. — Les reins ont été examinés après l'injection déchaînante.

Les phénomènes sont localisés à la zone corticale.

Tous les capillaires de cette région sont fortement dilatés

et gorgés de globules rouges. Par place même, on note la présence de petites hémorragies interstitielles sous-capsulaires.

Les glomérules sont absolument gorgés de sang.

Les globules rouges emplissent les pelotons glomérulaires, ils franchissent leur paroi et se retrouvent dans la cavité glomérulaire. On observe, d'ailleurs, que la lumière de nombreux tubes contournés est gorgée d'hématies.

Capsules surrénales. — Nous avons fait l'étude histologique des capsules surrénales chez quelques cobayes et quelques lapins après injection déchaînante.

Nous avons observé une vasodilatation des sinusoïdes avec gros appel sanguin et, irrégulièrement, des hémorragies peu importantes localisées à la zone corticale.

*
* *

Dans ce travail, nous n'avons eu pour but, en entreprenant des recherches histologiques, que de contrôler les résultats que nous avons constatés macroscopiquement.

Nous n'avons pas voulu faire de recherches cytologiques, parce que nous avons estimé qu'elles dépassaient notre compétence. En particulier, nous n'avons signalé de modifications des endothéliums qu'au niveau des capillaires pulmonaires, car là, vraiment, les ruptures nous ont paru évidentes. Mais nous n'avons pas voulu pousser nos observations sur les capillaires cutanés, car nous avons craint de tomber dans le domaine de l'interprétation.

Il nous semble intéressant, à présent, de comparer les observations histologiques de nos prédécesseurs avec celles que nous avons pratiquées nous-même.

A l'origine, Shwartzman [50] a trouvé au niveau du derme, cinq et vingt-quatre heures après l'injection intraveineuse déchaînante, des thromboses pariétales veineuses, de la transformation hyaline des vaisseaux, de l'œdème périphérique, des ruptures vasculaires et de l'infiltration sanguine des tissus. Gerber [51], dans le laboratoire de Shwartzman, a fait une étude histologique plus poussée.

Il montre, tout d'abord, qu'il n'y a pas de parallélisme entre l'importance d'une injection préparante et l'inflammation qui résulte de l'injection cutanée subséquente. Une injection préparante peut donner une forte inflammation locale, alors que les effets d'une injection déchaînante peuvent être très minimes.

Gerber n'ose affirmer que les hémorragies qu'il a observées sont en relation avec la présence de capillaires rompus. Il constate de nombreuses thromboses veineuses, mais n'observe aucune altération cellulaire des endothéliums à ce niveau. Les vaisseaux affectés sont entourés de polynucléaires, que l'on voit même infiltrer la paroi vasculaire.

Shwartzman en conclut, dans son traité, qu'il n'y a pas encore de preuves morphologiques de lésions endothéliales.

En ce qui concerne les viscères, Gerber constate après une simple injection intraveineuse de filtrat, au niveau du cœur, un gonflement irrégulier des fibres cardiaques avec dégénérescence cireuse, parfois des foyers de nécrose et une infiltration interstitielle à grands monocytes, à lymphocytes et à polynucléaires. An niveau du foie, des foyers de nécrose et des thromboses veineuses. Les thrombi se rencontrent surtout dans les veines centro-lobulaires, rarement dans les espaces portes ; ils sont formés de masses d'éosinophiles, d'érythrocytes et de polynucléaires. On observe parfois, en même temps, une infiltration sous-endothéliale.

Au niveau des poumons, Gerber observe de l'œdème, des hémorragies et des thromboses. Au niveau de la rate, des nécroses en foyers, des thromboses des sinus et des artérioles des corpuscules de Malpighi. Il existe quelques foyers de nécrose avec hémorragie, limités au niveau du cortex surrénalien et, au niveau de la moelle osseuse, des nécroses capillaires et des thromboses veineuses.

Karsner et Moritz [52] constatent, au niveau de la peau, qu'après injection préparante, il apparaît de l'œdème et une infiltration inflammatoire à grands monocytes.

Pour ces auteurs, les effets de l'injection déchaînante ne diffèrent que par une intensité plus grande des phénomènes inflammatoires et une atteinte plus marquée des vaisseaux sanguins. Ces vaisseaux sont dilatés et il y a formation

d'hémorragies. L'infiltration cellulaire est plus intense et il y a phagocytose de débris cellulaires nécrosés.

Pour Apitz [53], les hémorragies profuses qui apparaissent après l'injection déchaînante résultent de lésions profondes des vaisseaux sanguins. Il décrit des lésions sous la forme de fortes migrations leucocytaires à travers la paroi vasculaire et la formation de thrombi de plaquettes au niveau de cette paroi. Il signale également des karyorrhexis et des dégénérescences graisseuses des cellules endothéliales. Par la suite, le tissu lésé se nécrose et se sépare des tissus environnants par une démarcation nette.

Au niveau des viscères, il décrit des nécroses du muscle cardiaque, du foie et de la rate, des foyers de dégénérescence graisseuse, des gonflements des organes parenchymateux et de l'œdème pulmonaire.

Après injections répétées de filtrats par voie intraveineuse, Apitz signale la fréquence et l'intensité des hémorragies rénales, les lésions étant les nécroses corticales, la néphrose glomérulo-tubulaire, avec ou sans infarctus.

Gerber retrouve d'ailleurs, dans les mêmes conditions, des lésions histologiques identiques au niveau du rein. Il décrit également des nécroses corticales avec hémorragies étendues. Kielanowski et Selzer [54] prélèvent des fragments de peau pour biopsie à des intervalles répétés après injection déchaînante intraveineuse. L'injection préparante a été pratiquée dix-neuf à vingt-deux heures auparavant, par voie intradermique. Le premier prélèvement a été pratiqué immédiatement avant l'injection déchaînante, les autres à intervalles rapprochés après cette injection et cela jusqu'à soixante-six heures après la déchaînante. Il ressort de leurs études histologiques que l'œdème, l'émigration leucocytaire périvasculaire et les thromboses veineuses ne sont point caractéristiques d'une réaction hémorragique positive, puisqu'on les observe sous l'influence de l'injection préparante et en cas de réaction déchaînante négative. La réaction déchaînante positive se caractérisera par un afflux sanguin important, avec dilatation excessive des capillaires, dont la rupture est la cause de l'infiltration sanguine. Ils constatent des lésions inconstantes de vacuolisation des cellules endothéliales. L'infiltration sanguine appa-

raît précocement dans la couche papillaire du derme et autour des muscles striés du tissu sous-cutané. Ces muscles subissent d'ailleurs des lésions dégénératives.

Kielanowski et Selzer donnent des hémorragies l'explication suivante. L'afflux sanguin provoqué par des changements humoraux, dont la nature nous échappe encore, provoque une augmentation de pression sanguine locale au niveau des capillaires. Cette augmentation est d'autant plus grande que les thromboses veineuses pariétales et oblitérantes empêchent une circulation veineuse normale. C'est cette augmentation excessive de pression qui provoque la rupture des capillaires.

En résumé, les phénomènes que les auteurs qui nous ont précédé décrivent au niveau des capillaires du derme, là où se réalisent les hémorragies, ne rendent que très incomplètement compte des manifestations cytologiques qui accompagnent les hémorragies. En d'autres termes, aucune étude histologique ne permet d'affirmer que ces hémorragies soient provoquées par une lésion des endothéliums de ces capillaires.

Bien que déjà, en 1928, Kolesnikoff [55], collaborateur de Zdrodovski, ait décrit, au niveau des endothéliums, des phénomènes de dégénérescence et de l'infiltration graisseuse et qu'il attribue à ces lésions la cause des hémorragies, cette description est beaucoup trop vague pour qu'on puisse nettement s'y référer. En ce qui concerne, à proprement parler, les lésions des endothéliums, les autres descriptions sont à peine moins imprécises.

Shwartzman décrit des transformations hyalines de la paroi des vaisseaux, mais Gerber ne constate aucune altération des cellules endothéliales. Apitz, par contre, signale des karyorrexis et des dégénérescences graisseuses des éléments endothéliaux. Kielanowski et Selzer notent des lésions, inconstantes d'ailleurs, de vacuolisation des cellules de l'endothélium.

En résumé, les lésions que l'on observe au niveau de ces éléments sont variables et, semble-t-il, inconstantes.

Personnellement, au niveau de la peau, nous n'avons jamais observé de lésions dégénératives des cellules endothéliales, soit après injection préparante, soit après injection déchaînante ; nous avons au contraire observé que ces éléments étaient habituellement très aplatis et ne présentaient ni phénomène de des-

truction nucléaire, ni phénomène de régénération mitotique. Cependant, il est habituel d'observer, dans l'une et l'autre expériences, des granulations accolées aux cellules endothéliales et même phagocytées par elles. Ces granulations sont identiques à celles que l'on observe au niveau du derme après une injection de toxine.

Il est logique d'admettre cependant que des cellules qui ont fixé des toxines voient leur vitalité fortement compromise et soient en état de moindre résistance. On peut donc admettre qu'à ce niveau se produisent aisément des ruptures vasculaires.

Mais on peut se demander pourquoi ces ruptures ne se produisent qu'au moment de l'injection déchaînante, puisque, nous l'avons vu, les altérations vasculaires sur lesquelles nous venons d'insister se produisent dès l'injection préparante.

C'est une question à laquelle les simples faits histologiques ne permettent pas de répondre et l'on doit se borner à faire cette constatation que, d'une part, les capillaires, à la suite de l'injection préparante, sont dilatés mais ne contiennent qu'une faible quantité de globules rouges, tandis qu'après l'injection déchaînante, et cela dès l'heure qui suit celle-ci, les capillaires sont gorgés d'hématies. Il est vraisemblable que c'est à ce brusque afflux de globules rouges que cède l'endothélium altéré par la toxine.

Tous les auteurs que nous avons cités insistent sur la présence de thromboses vasculaires au niveau des veines. Nous avons également retrouvé ces thromboses. A la peau, elles siègent au niveau des rameaux veineux du derme profond. Elles sont constituées, outre la fibrine, par de nombreux polynucléaires, des monocytes et des hématies.

Il est évident que la présence de ces thrombi plaide également en faveur d'une altération des endothéliums, altération qui favorise leur formation.

D'autre part, comme l'indiquent Kielanowski et Selzer, par l'obstacle qu'ils apportent à l'afflux sanguin consécutif à l'injection déchaînante, ils favorisent la rupture endothéliale des capillaires situés en amont et, par conséquent, la formation des hémorragies.

Enfin, les auteurs insistent également sur l'importance de l'infiltration inflammatoire qui siège autour des vaisseaux dans

les zones injectées et cela dès les heures qui suivent l'injection préparante.

Nos observations sont également en plein accord avec ces constatations. Dès les premières heures qui suivent l'injection, de nombreux polynucléaires infiltrent le derme environnant les capillaires ; un examen plus attentif permet de voir que ces polynucléaires sont tout d'abord accolés en grand nombre à la paroi interne des capillaires ; ils sont de grande taille, contiennent des granulations et présentent des phénomènes d'altération vasculaire ; secondairement, on les voit s'insinuer entre les parois mêmes de ces vaisseaux et ces passages, qui se répètent en très grand nombre, peuvent également contribuer à diminuer la résistance des parois vasculaires.

Cependant, malgré tous ces phénomènes morphologiques, nous ne pensons pas que de simples faits histologiques puissent expliquer la raison initiale des hémorragies.

En effet, toutes les altérations que nous venons de décrire se retrouvent dès les premières heures qui suivent l'injection préparante et, comme Gerber l'a déjà fait remarquer, elles peuvent s'observer aussi en cas d'injection déchaînante négative ; elles constituent, par conséquent, uniquement des circonstances favorables à l'apparition d'une hémorragie, mais le développement de ces hémorragies est uniquement lié à la création de l'afflux sanguin périphérique qui, lui, ne se manifeste qu'en cas d'une réaction déchaînante positive.

Les lésions du foie, sur lesquelles nous nous sommes étendu, ont été déjà signalées précédemment. Gerber insiste sur le fait que le foie peut être le siège de foyers de nécrose et de thromboses vasculaires ; Apitz, également, signale ces phénomènes de nécrose hépatique. Ces auteurs décrivent l'apparition de phénomènes thrombotiques et nécrotiques, dans le foie, dès les heures qui suivent une injection préparante par voie veineuse. C'est bien ce que nous avons observé et, comme nous, Gerber constate que les nécroses frappent le centre des lobules et que ce sont les veines centro-lobulaires qui sont principalement thrombosées. L'étendue de ces nécroses est frappante. Déjà, après une injection préparante, la plus grande partie des lobules hépatiques peut être altérée et l'on peut se demander si la glande ne joue pas un rôle important dans

l'évolution du phénomène. Nous avons vu, toutefois, que seules les injections préparantes peuvent réaliser ces nécroses ; après de simples injections intradermiques, le foie reste absolument inaltéré.

Gerber et Apitz ont insisté sur les lésions du rein après injection intra-veineuse. Nous avons vu qu'après injection déchaînante, les glomérules devenaient perméables aux hématies, le peloton glomérulaire se gorge de globules rouges et ceux-ci franchissent la paroi endothéliale et forment de véritables cylindres dans la lumière des tubes contournés. Par conséquent, il faut admettre, pour que puissent se réaliser ces phénomènes, une lésion profonde de la paroi des glomérules. Il y a également des lésions des capillaires interstitiels, puisque nous avons noté de petits foyers hémorragiques sous-corticaux.

Bien que les lésions pulmonaires ne soient qu'incidemment citées par les auteurs sous l'aspect d'œdème, d'hémorragies ou de thromboses, nous avons insisté sur ces lésions, car, par suite des circonstances anatomiques favorables, nous avons vu, au niveau des capillaires pulmonaires, de véritables ruptures des endothéliums. Des ruptures semblables ont d'ailleurs été décrites par J. Weir [56]. Elles se présentent très nettement dans des régions où l'hémorragie n'est pas trop violente.

En résumé, qu'il s'agisse des capillaires cutanés dans une région préparée ou des capillaires viscéraux, les hémorragies sont consécutives à l'afflux sanguin déterminé par l'injection déchaînante ; mais les altérations vasculaires sont le fait de l'injection préparante, qui crée une sorte d'équilibre instable. Que survienne une hyperémie avant que soit rétabli l'état normal et on verra l'endothélium céder sous une pression anormale, à laquelle il est momentanément incapable de résister.

Qu'il me soit permis d'exprimer ici à M. le Professeur Renaux mes sentiments de profonde gratitude. Sans la lumière de ses conseils, sans sa critique sévère, mais toujours bienveillante, sans les paroles d'encouragement prodiguées aux moments de lassitude et de doute, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

BIBLIOGRAPHIE

[1] SANARELLI (G.) Ces *Annales*, **8**, 1894, p 193.
[2] SANARELLI (G.). *C. R. de l'Acad. Sc.*, **163**, 1916, p. 538.
[3] SANARELLI (G.). Ces *Annales*, **38**, 1924, p. 11.
[4] ZDRODOVSKI (P.) et BRENN (E.). *Centralbl. f. Bakt. orig.*, **94**, 1925, p. 155.
[5] ZDRODOVSKI (P.). Ces *Annales*, **42**, 1928, p. 1242.
[6] SHWARTZMAN (G.). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **25**, 1927-1928, p. 560 ; *Journ. Exp. Med*, **48**, 1928, p. 247.
[7] SHWARTZMAN (G). *Proc. Soc. Exp. Med. and Biol.*, **26**, 1928, p. 207.
[8] BURNET (F.). *Journ. Path. and Bact*, **34**, 1931, p. 1290.
[9] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1931, p. 1290.
[10] BORDET (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1931, p. 236.
[11] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol*, **107**, 1931, p. 236.
[12] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 1579 ; **108**, 1931, p. 238.
[13] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol*, **108**, 1931, p. 425.
[14] BORDET (P.). *C R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 622
[15] BORDET (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p 1465.
[16] BORDET (P.). Ces *Annales*, **56**, 1936, p 325.
[17] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc Biol*, **118**, 1935, p. 1196.
[18] ALECHINSKY (A.). I. Internat Medicinische Woche in der Schweis (Montreux, 9-14 septembre 1935) : *Annali d'igiene*, **45**, 1935, p. 673.
[19] DURAN-REYNALS. *Journ. Exp. Med.*, **58**, 1933, p. 451.
[20] ALECHINSKY (A). *C. R Soc Biol*, **119**, 1935, p. 1199.
[21] SHWARTZMAN (G). *Journ. Exp Med*, **62**, 1935, p. 621.
[22] GRATIA et LINZ. Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 131.
[23] SHWARTZMAN (G). *Journ. Exp. Med.*, **51**, 1930, p. 571.
[24] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 234.
[25] ALBUS, GUNTHER et SHWARTZ (Hugo). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, **93**, 1938, p. 403.
[26] GRATIA et LINZ. *C. R. Soc. Biol*, **109**, 1938, p. 585; Ces *Annales*, **50**, 1933, p. 89.
[27] BOCK (H.). *Centralbl. f. Bact. Orig.*, **125**, 1932, p. 435.
[28] BORDET (P). Ces *Annales*, **57**, 1936, p. 357.
[29] ALECHINSKY (A). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p 289.
[30] PRAUSNITZ-KUSTNER. *Centralbl. f Bact.*, **86**, 1931, p. 160.
[31] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 148.
[32] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1936, p. 148.
[33] GROSS (H). *Klin. Woch.*, **11**, 1932, p. 1473.
[34] FRISCH (I). *Arch. Int Med*, **46**, 1930, p. 40.
[35] GROSS (H.). *Centralbl. f. Bact. Orig.*, **123**, 1931, p. 96 et 123.
[36] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 166.
[37] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 790.
[38] ALECHINSKY (A). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 513.
[39] ALECHINSKY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 514.

[40] MESROBEANU (L.). *Thèse de Strasbourg*, 1936. Masson, éditeur (Paris).
[41] BOIVIN et MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 307.
[42] RAISTRICK et TOPLEY. *Brit. Journ. Exp. Path.*, **15**, 1934, p. 113.
[43] DELAFIELD (M. E.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **15**, 1934, p. 130.
[44] MARTIN (A. R.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **15**, 1934, p. 137.
[45] HUDDLESON et PENNELL. Second. Intern. Congress for Microbiology (1936).
[46] LISBONNE et MONNIER. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 114.
[47] TOPLEY et WILSON. *The Principles of Bacteriology and Immunity*, 2e édition, 1936.
[48] BOIVIN et MESROBEANU. *Rev. Immun.*, **1**, 1935, p. 555 ; **2**, 1936, p. 113.
[49] BOIVIN, BOIVIN et IZARD. *C. R. Acad. Sc.*, **203**, 1936, p. 284 ; *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 25.
[50] SHWARTZMAN (G.). *Phenomenon of local tissue reactivity*. P. Hoeber, New-York, 1937.
[51] GERBER (I.). *Arch. Path.*, **21**, 1936, p. 331 et 776.
[52] KARSNER et MORITZ. *Journ. Exp. Med.*, **60**, 1934, p. 37.
[53] APITZ (K.). *Wirchow's Arch. Path. Anat.*, **293**, 1934, p. 1.
[54] KIELANOVSKI et SELZER. *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 1934, p. 648.
[55] KOLESSNIKOFF. Cité par ZDRODOVSKI. *Ces Annales*, **42**, 1928, p. 1242.
[56] WEIR (J. W.). *Journ. Immunol.*, **34**, 1938, p. 76.

CURARISATION ET CHRONAXIE

par P. DE BERREDO CARNEIRO.

(*Laboratoire de Chimie biologique de l'Institut Pasteur.*)

« Nous sacrifierons des hypothèses et des théories tant qu'il en faudra, pourvu que nous découvrions des faits nouveaux qui seront les seules réalités indestructibles sur lesquelles la science positive doit se fonder et s'élever peu à peu. »

CLAUDE BERNARD.

(*Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médecine.*)

L'histoire chimique du curare, poison à flèche des Indiens de l'Amazone et de l'Orénoque, commence par les travaux de Roulin et Boussingault, en 1827. Son étude pharmaco-dynamique débute avec Claude Bernard, en 1844. Malgré de nombreuses recherches réalisées dans ces deux directions pendant environ un siècle, plusieurs points encore obscurs et contradictoires imposaient une révision d'ensemble de la question.

Dans un travail précédent [1] nous avons exposé les résultats auxquels nous a conduit l'examen chimique de deux échantillons de curare, originaires du bassin amazonique, et de différentes espèces de *Strychnos* de la même région. Après avoir isolé, par le réactif de Gabriel Bertrand [2], les principes actifs présents dans nos petits pots de poison, nous les avons retrouvés dans *Strychnos lethalis* Barb. Rod. L'hypothèse d'une origine animale du curare était ainsi définitivement éliminée. L'identification de la plante utilisée par les Indiens mettait fin, en même temps, aux discussions qui partageaient les naturalistes, les uns attribuant aux Ménispermées et les autres aux Strychnées, l'élaboration des principes curarisants.

Ces recherches nous ont permis d'établir que la toxicité du curare provient de deux alcaloïdes distincts dont nous avons

déterminé les poids moléculaires, la composition élémentaire et les spectres de fluorescence. Ces deux bases organiques que nous avons dénommées *Strychnoléthaline* ($C_{22} H_{24} O_4 N$) et *Curaléthaline* ($C_{25} H_{31} O_7 N$) se retrouvent en proportions variables dans les échantillons de curare examinés et dans l'écorce de *Strychnos lethalis* Barb. Rod. D'après leur composition elles diffèrent sensiblement des alcaloïdes de même action physiologique déjà signalés par Boehm, King et Wieland.

Comme suite à ces investigations chimiques nous avons procédé à l'étude pharmaco-dynamique comparative de la strychnoléthaline et du poison à flèche dont elle fut extraite. Nous nous sommes servi, dans ce but, de deux échantillons différents de curare : le premier provenait directement des Indiens Ticunas ; le second faisait partie de la collection de Paul Bert et nous fut donné par M. le professeur P. Portier.

Le point de vue de Claude Bernard.

Afin de bien fixer la manière dont le grand maître de la physiologie moderne concevait le phénomène de la curarisation, nous transcrirons textuellement quelques-uns de ses aperçus, en soulignant les passages qui nous intéressent de plus près [**3**].

« Dans le mois de juin 1844, je fis ma première expérience sur le curare : j'insinuai sous la peau du dos d'une grenouille un petit fragment de curare sec et j'observai l'animal. Dans les premiers moments, la grenouille allait et sautait comme avant, avec la plus grande agilité, puis elle resta tranquille. Au bout de *cinq minutes*, les jambes de devant cédèrent, le corps s'aplatit et s'affaissa peu à peu. *Après sept minutes la grenouille était morte*, c'est-à-dire qu'elle était devenue molle, flasque, et que le pincement de la peau ne déterminait plus chez elle aucune réaction vitale. »

« En ouvrant la grenouille empoisonnée, je vis que son cœur continuait à battre, son sang rougissait à l'air et présentait ses propriétés physiologiques normales. Je me servis ensuite de l'électricité comme de l'excitant le plus convenable pour

réveiller et provoquer la réaction physiologique des éléments nerveux et musculaires. En agissant directement sur les muscles, l'excitant produisait des contractions violentes dans toutes les parties du corps ; *mais en agissant sur les nerfs eux-mêmes il n'y avait plus aucune réaction. Les nerfs, c'est-à-dire les tubes nerveux qui les composent, étaient donc complètement morts,* tandis que les autres éléments organiques des muscles, du sang, des muqueuses étaient très vivants et conservaient encore leurs propriétés physiologiques pendant un grand nombre d'heures, ainsi que cela se voit surtout chez les animaux à sang froid. »

« En parcourant les diverses phases de l'empoisonnement, nous avons vu que *le curare détruit le mouvement en laissant persister la sensibilité. De plus, nous avons prouvé qu'il n'atteint qu'un des éléments efficaces du mouvement, le nerf moteur,* car le cœur continue à battre, et les muscles ont conservé leurs facultés contractiles intactes. »

On voit donc que pour Claude Bernard l'action caractéristique du curare est de tuer l'élément nerveux, tout en respectant l'élément musculaire. Une fois mort, le nerf n'est plus excitable au courant galvanique. Cet effet secondaire n'est pas lié à l'action spécifique du curare, mais à la destruction du tissu nerveux, quel qu'en soit l'agent.

La théorie chronologique de Lapicque.

L. et M. Lapicque expliquent tout autrement le phénomène de la curarisation [**4**]. Ils rattachent ce trouble à la théorie de l'excitabilité en fonction du temps et lui donnent une définition nouvelle. L'interprétation de Claude Bernard est abandonnée. L'étude directe des modifications anatomiques ou physiologiques provoquées par le curare cède la place à des mesures d'excitation des muscles et des nerfs moteurs. Les effets du courant électrique et les rapports entre ses différentes caractéristiques (durée, intensité, forme de l'onde, etc.) passent au premier plan et font quelque peu oublier les transformations bio-chimiques qui sont à la base de l'empoisonnement par le curare.

Pour Lapicque, la transmission de l'influx nerveux est essentiellement électrique. Il est ainsi porté à assimiler le processus physiologique de l'excitation aux effets du courant galvanique, et à raisonner sur celui-là d'après des lois purement physiques.

Selon la théorie chronologique de l'excitabilité, un muscle et son nerf moteur, à l'état normal, sont isochrones. Le curare, d'après les propres termes de Lapicque, sans toucher à la chronaxie nerveuse, augmente la chronaxie musculaire, plus ou moins suivant la dose, et le décrochement se produit quand les chronaxies des deux tissus présentent entre elles un écart déterminé, en sorte que l'arrêt de la transmission semble dû à cet hétérochronisme.

L'excitabilité indirecte du muscle est abolie, mais son excitabilité directe subsiste et, contrairement à l'affirmation de Claude Bernard, le nerf reste, pour lui-même, excitable et conducteur. La curarisation est dès lors définie par cette simple variation de chronaxie, indépendamment de l'agent qui la provoque : l'hétérochronisme est sa seule condition constante. Toutes les substances toxiques capables de produire, directement ou indirectement, cet effet, sont groupées sous la dénomination commune de poisons curarisants (strychnine, spartéine, scopolamine, vératrine, méthylmorphine, méthylquinine, méthylstrychnine, quinoline, pyridine, pipéridine, camphre, venin de cobra, etc.).

En serrant de plus près la question, Lapicque établit que la curarisation apparaît dans chaque cas au moment où la chronaxie du muscle est *deux fois plus grande* que celle du nerf, ce qui le conduit à ériger en loi générale que l'isochronisme du nerf et du muscle est la condition nécessaire à la transmission.

En résumé, pour Claude Bernard, l'action essentielle du curare est de « détruire le mouvement en laissant subsister la sensibilité », la cause immédiate de la paralysie et de l'abolition de l'excitation indirecte étant la mort du nerf moteur. Pour L. Lapicque, le nerf moteur subsiste intact. La curarisation est uniquement déterminée par l'hétérochronisme d'origine musculaire.

Observations et expérimentations personnelles.

Afin d'établir, préliminairement, que la strychnoléthaline séparée par nous est une base curarisante, nous avons répété les expériences classiques de Claude Bernard avec la grenouille, en interceptant le passage du sang artériel dans les pattes du train postérieur par la ligature des artères, tout en laissant intacts les nerfs qui font communiquer ces membres avec la moelle épinière. Aussi bien avec la strychnoléthaline qu'avec nos deux échantillons de curare, les résultats furent concordants : *conservation de la sensibilité et abolition de la motricité.* Mais, contrairement à l'observation de Claude Bernard, le sciatique des grenouilles complètement paralysées continue de transmettre l'excitation électrique. Cette divergence nous semble provenir du fait que Claude Bernard curarisait ses animaux d'expérience par l'insertion sous-cutanée d'un fragment de curare, sans pouvoir nullement contrôler la dose effective de poison introduit dans l'organisme. D'après son propre témoignage, *sept minutes après* la grenouille était morte. Les proportions relativement énormes de principes actifs ainsi absorbés entraînaient rapidement l'altération du tissu nerveux.

Notre manière d'opérer est beaucoup plus douce. Les solutions titrées que nous injectons dans le sac lymphatique des grenouilles ne provoquent la paralysie totale qu'après une heure et demie à deux heures de lente absorption. Nous sommes cependant arrivé au même résultat que Claude Bernard par l'emploi d'une dose cent fois plus grande que celle nécessaire à déterminer la paralysie totale Dans ces conditions, on confond en une seule deux étapes distinctes de la curarisation : la suppression de la motricité avec conservation de la sensibilité et l'abolition de l'excitabilité électrique indirecte. En travaillant avec des solutions très diluées, de toxicité connue, nous avons pu dissocier ces deux effets du poison jusqu'ici confondus.

Les conceptions fondamentales concernant le mécanisme de la curarisation étant ainsi mises en jeu, l'examen approfondi

de la question, du point de vue de la chronaxie, devenait indispensable. Nous l'avons entrepris en employant le procédé de Lapicque par les condensateurs, avec les précautions nécessaires. Nos essais ont porté sur le sciatique-gastrocnémien de grenouille, tantôt à l'état normal, tantôt sous l'action du curare ou de la strychnoléthaline, en solutions titrées. Dans l'un et l'autre cas nos déterminations ont été faites après la destruction de la moelle. A titre comparatif, quelques mesures ont été aussi réalisées après la section du nerf sciatique à sa racine. Les résultats ont toujours été absolument concordants (1). Les doses mortelles de la strychnoléthaline par voie sous-cutanée sont de 1,4 γ par gramme pour le cobaye et de 1 γ par gramme pour le lapin. La grenouille supporte des doses bien plus fortes ; on peut, cependant, la paralyser totalement avec 2 γ par gramme.

En ce qui concerne le nerf et le muscle des grenouilles non curarisées, nos déterminations coïncident parfaitement avec celles publiées par L. et M. Lapicque. Par contre, sur des grenouilles paralysées, soit par la strychnoléthaline, soit par le curare, avec 2 γ par gramme, de principe actif, nos mesures de chronaxie nous ont conduit à des résultats différents.

La composition du curare étant jusqu'alors inconnue, les physiologistes ne pouvaient pas fonder leurs expériences sur des données quantitatives. D'autre part, les différents curares d'origine indienne, provenant de la décoction de nombreuses plantes inconnues, pouvaient éventuellement provoquer, en plus de la curarisation, d'autres troubles neuro-musculaires.

Le tableau ci-après reproduit quelques-unes des valeurs que nous avons trouvées sur une vingtaine de grenouilles examinées. Deux faits nouveaux ressortent de ces expériences.

1° L'augmentation de la chronaxie du gastrocnémien par l'effet de la strychnoléthaline ou du curare peut atteindre des

(1) Nos mesures de chronaxie ont été réalisées au Laboratoire de Chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur. Nous tenons à remercier M Bovet d'avoir bien voulu mettre à notre disposition l'appareillage nécessaire à ces déterminations, et du cordial accueil qu'il nous a réservé

valeurs dix fois plus grandes que la valeur normale sans entraîner l'abolition de l'excitation électrique indirecte.

2° Chez la grenouille paralysée par la strychnoléthaline ou par le curare, à des doses convenables, l'excitation indirecte donne pour la chronaxie des valeurs identiques à celles de la grenouille normale.

Chronaxie du sciatique-gastrocnémien (excitation directe et indirecte) en fonction du temps écoulé après la dissection (τ : chronaxie en millièmes de seconde).

POIDS en grammes	TEMPS en heures	EXCITATION directe en τ	EXCITATION indirecte en τ
I. — *Grenouilles normales* :			
58	1/2	0,38	0,29
46	3	0,37	0,31
II. — *Grenouilles paralysées par la strychnoléthaline* :			
65	1/2	3,93	0,26
45	2	2,59	0,29
III. — *Grenouilles paralysées par le curare des Ticùnas* :			
52	1/2	3,96	0,34
63	4	2,88	0,31
IV. — *Grenouilles paralysées par le curare de la collection de Paul Bert* :			
75	1/2	4,20	0,38
48	2	3,66	0,33

La persistance de l'excitation au courant galvanique d'un muscle volontaire, à travers son nerf moteur, chez un animal curarisé, alors que l'isochronisme de l'état normal a fait place à un hétérochronisme prononcé, rend évident que le processus physiologique de l'excitation diffère essentiellement de la stimulation électrique. La signification des schémas purement physiques de l'excitation est d'ailleurs, depuis longtemps, mise sérieusement en doute [5]. D'autre part, la théorie des médiateurs chimiques s'enrichit chaque jour de faits qui révolutionnent la physiologie nerveuse. La fonction de l'adrénaline et de l'acétylcholine libérées par les terminaisons nerveuses, d'abord restreinte au système nerveux autonome, s'est ensuite étendue aux excitations motrices. Les travaux de Loewi et Dale ont ouvert des voies d'une grande

fécondité et tout laisse entrevoir que la transmission nerveuse dépend essentiellement de facteurs biochimiques.

C'est dans ce cadre que le phénomène de la curarisation trouvera, certainement, une explication satisfaisante. Dès maintenant, il faut cependant définir ce trouble fonctionnel par ses attributs fondamentaux : abolition de la motricité et conservation de la sensibilité. Le groupe hétérogène et mal défini des poisons curarisants doit être, en outre, réduit aux seuls principes toxiques capables de produire un tel effet par une action périphérique. Ces acceptions nouvelles s'imposent car, selon la judicieuse remarque de Claude Bernard « si l'on perd les phénomènes de vue pour s'attacher aux mots, on est bien vite en dehors de la réalité ».

BIBLIOGRAPHIE

[1] De Berredo-Carneiro (P.). *C. R. Acad. Sc.*, **206**, 1938, p. 1202.

[2] Bertrand (Gabriel). *C. R. Acad. Sc.*, **128**, 1899, p. 742 , *Bull. Soc. Chim.*, **21**, 1899, p. 434.

[3] Bernard (Claude). *Etudes physiologiques sur quelques poisons américains*, 1864.

[4] Lapicque (Louis). *L'excitation en fonction du temps*, 1926. *La chronaxie et ses applications physiologiques*, 1938.

[5] Ozorio de Almeida (M.). A propos de la nouvelle théorie de l'excitation électrique des tissus de A.-M. Monnier *Ann. da Academia Brasileira de Sciencias*, 1934

Le Gérant : G. Masson.

Imprimé par l'Ancne Impie de la Cour d'Appel, A. Maretheux, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France).



Fig. 1 — Réaction hémorragique de l'oreille gauche quatre heures après l'injection déchaînante. Oreille droite normale

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

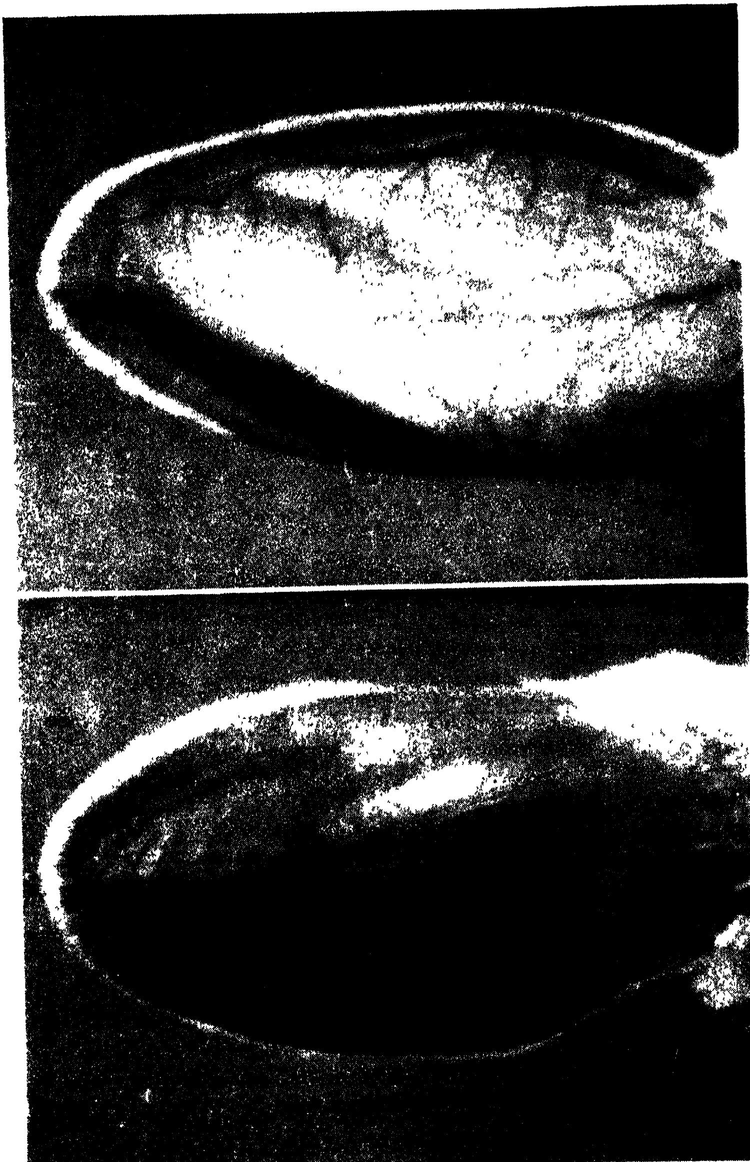


Fig. 2. — Oreille gauche. Fig. 3. — Oreille droite.

Fig. 2 et 3. — Les oreilles du même lapin vingt-quatre heures après l'injection déchaînante.



Fig. 4. — Autre exemple de réaction hémorragique intense vingt-quatre heures après l'injection déchaînante

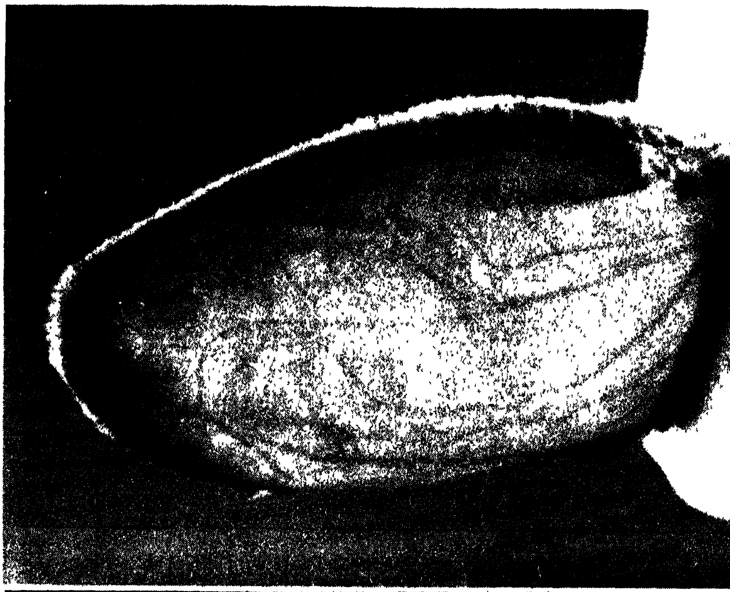


Fig. 5. — Oreille témoin normale



FIG. 6. — Réaction hémorragique obtenue à l'aide d'un filtrat de culture sur gélose de vingt-quatre heures.



FIG. 7. — Réaction hémorragique obtenue à l'aide d'un filtrat de culture sur bouillon de six jours.

MASSON ET Cie, ÉDITEURS



Fig. 8 — Réaction purpurique du gros intestin.



Fig. 9. Taches hémorragiques à l'intestin grêle

MASSON ET Cie, ÉDITEURS



Fig. 10. — Rein ponctué de nombreuses pétéchies, vessie congestionnée, péritoine pariétal et diaphragme présentant de larges ecchymoses.



Fig. 11. — Grande plaque hémorragique avec nécrose de la paroi antérieure de l'estomac.

MASSON ET Cie, ÉDITEURS



Fig. 12. — Nombreuses taches hémorragiques du poumon.
Rate noire infiltrée de sang.



Fig. 13. — Nappe hémorragique
couvrant environ 2/3 de la surface de l'oreille.



FIG. 14. — Œil de lapin albinos. Corps ciliaire normal.



FIG. 15. — Œil de lapin albinos.
Injection préparante : corps ciliaire fortement œdématié.



FIG. 16 — Œil de lapin albinos. Injection déchaînante : corps ciliaire œdématié entièrement hémorragique par rupture des parois vasculaires.



FIG. 17 — Oreille de lapin. Injection préparante. Thrombose dans une grosse veine.

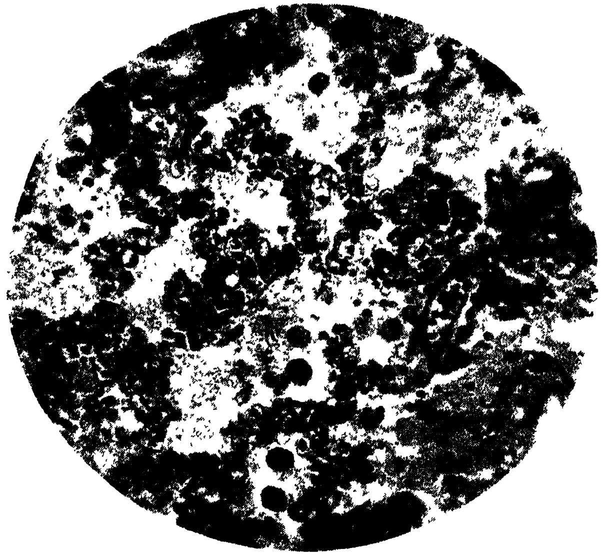


Fig. 18. — Poumon. Injection déchaînante. Région en dehors d'une zone d'hémorragie massive, œdème des parois alvéolaires. Dilatation des capillaires avec ou sans hématies.

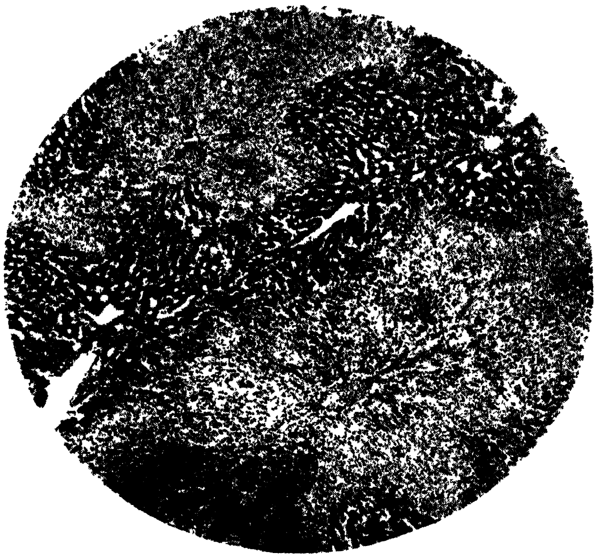


Fig. 19. — Foie. Injection préparante par voie veineuse. Grosses zones de nécrose autour des veines centro-lobulaires qui sont thrombosées.

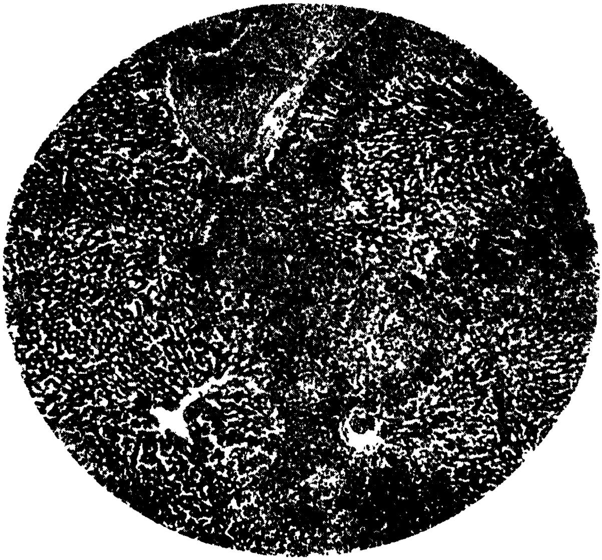


Fig. 20. — Injection déchainante. Zones de nécrose comme en 19. Thrombose dans une grosse veine.



Fig. 21. — Rein. Injection déchainante. Réplétion des glomérules par des hématies. Passage de ces hématies dans les tubes contournés et debut d'hémorragies interstitielles.

T. 63 AOUT 1939 N° 2

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

MODE DE PÉNÉTRATION DES BACILLES DE STEFANSKY AU TRAVERS DE LA PEAU FRAICHEMENT ÉPILÉE

par E. MARCHOUX et V. CHORINE.

L'un de nous, avec Sorel en 1911 (1), a montré que le bacille de Stefansky déposé sur la peau saine d'un rat, même sur la peau fine et rose d'un rat qui vient de naître, ne cause aucune infection; mais il suffit d'arracher quelques poils et de beurrer le tégument fraîchement épilé avec du liquide septique pour que 100 p. 100 des animaux s'infectent. L'expérience, répétée maintes fois depuis dans le laboratoire, a toujours donné des résultats identiques. Nous avons cherché longuement à saisir le mécanisme de la pénétration des germes dans l'organisme après épilation. Sur des milliers de coupes nous n'avons distingué aucune porte d'entrée; cependant un de nos collaborateurs, M. Thibault, avait trouvé dans un prélèvement fait quarante-huit heures après le début de l'expérience, une cellule du derme qui renfermait de nombreux bacilles, dont il avait été impossible de trouver la voie de pénétration.

Nous avons décidé de reprendre cette étude pour essayer de déceler le processus de l'infection. Les coupes perpendiculaires à la surface de la peau, après examen d'une multitude d'entre elles, ne nous ont pas renseignés. Nous avons alors

(1) MARCHOUX (E.) et SOREL (F.). Ces *Annales*, **26**, 1912, p. 675.

décidé de pratiquer la coupe parallèlement à la surface et nous nous sommes aperçus avec étonnement que ces poils que nous croyions enlever avec le bulbe se cassaient presque tous au ras de la peau. D'ailleurs, en examinant une touffe de poils que l'on vient d'arracher, on peut rarement en trouver un seul qui porte le bulbe. Les poils cassés à fleur de peau, ou même à l'intérieur du canal, ne diminuent en

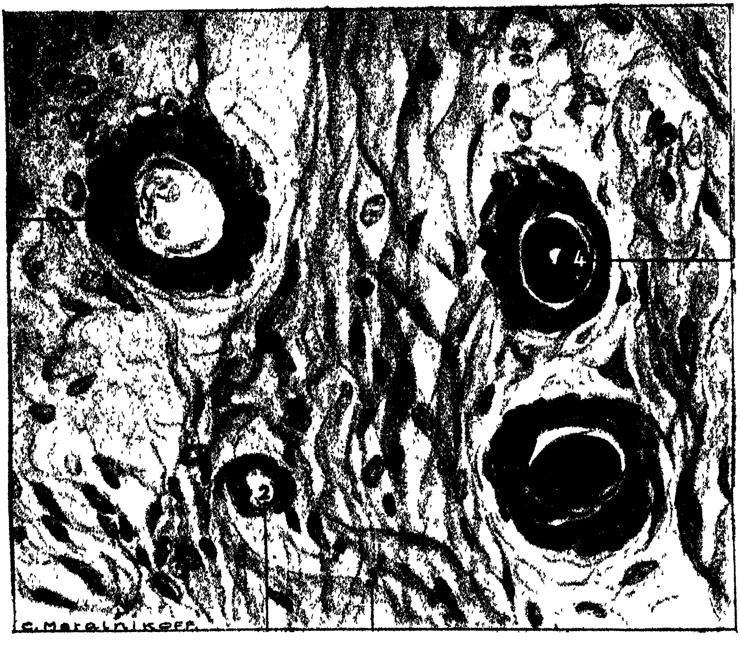


FIG. 1. — A gauche : 1, une gaine épithéliale vide de poil avec quelques bacilles de Stefansky dans la lumière du canal. A droite, deux poils non arrachés; 2, petite artériole; 3, tissu conjonctif; 4, poil bifide.

rien l'étanchéité du revêtement épidermique. Seul l'arrachement du bulbe, intéressant la continuité de la couche protectrice, provoque la formation d'une petite plaie qui, pour passer inaperçue, n'en représente pas moins une porte d'entrée. C'est par cette voie que le bacille de Stefansky, et peut-être d'autres germes, pénètrent dans l'intimité des tissus.

La technique opératoire pour ces examens est la suivante : on épile quelques rats, sur une surface de 1 ou 2 centimètres

carrés, choisie au niveau de la partie antérieure du dos pour la mettre à l'abri des dents ou des pattes de l'animal. On enduit cette surface de matériel septique. Pour faciliter l'examen par un apport de germes plus grand, on applique sur la peau épilée un tampon de coton hydrophile imbibé d'une émulsion épaisse de bacilles de Stefansky. On maintient en place pendant vingt-quatre heures ce tampon à l'aide d'une petite compresse de gaze collée tout autour avec du collodion sur la peau saine de l'animal.

On sacrifie un rat six heures, un autre vingt-quatre heures,

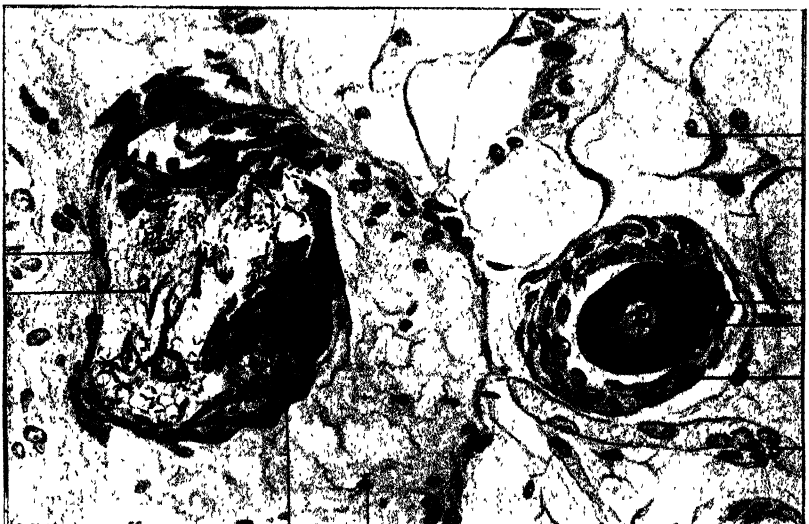


Fig. 2. — A gauche, reste de bulbe d'un poil arraché, nombreux globules rouges et bacilles de Stefansky dans la plaie. A droite, canal pileux avec un poil. 1, gaine épithéliale externe très distendue par hémorragie; 2, globules rouges et nombreux bacilles de Stefansky; 3, cellules du bulbe, restant après l'arrachement du poil; 4, chorion; 5, capillaire; 6, gaine épithéliale du poil; 7, substance corticale; 8, cellules graisseuses.

un troisième quarante-huit heures après le début de l'expérience et ainsi de suite. On prélève le morceau central de la peau épilée, on le fixe au mélange de Dubosq-Brasil et on l'inclut à la paraffine suivant la méthode habituelle.

On constate que les canaux pileux sont pratiquement tous remplis par le poil et nous n'avons jamais trouvé de bacilles

entre la gaine épithéliale externe et le poil. Il est vrai que chez le rat cet espace est le plus souvent inexistant. En revanche, dans les gaines vides nous rencontrons sans peine des bacilles acido-résistants (voir fig. 1), quelquefois en grand nombre. Les coupes des couches plus profondes, sauf les cas exceptionnels que nous signalons, révèlent l'intégrité des bulbes pileux. Il nous est arrivé de retrouver et de suivre sur plusieurs coupes en série l'emplacement d'un bulbe franchement arraché et d'y découvrir une plaie microscopique, souvent avec une petite hémorragie, comme on peut le voir sur la figure 2. Les bacilles de Stefansky se trouvent mélangés en grande quantité dans la plaie avec les globules rouges. On y trouve aussi des leucocytes, principalement des polynucléaires qui englobent les germes et qui vont, en se déplaçant, les véhiculer vers la profondeur.

Nous avons pu retrouver chez un rat sacrifié trois jours après le début de l'expérience, des germes acido-résistants déjà fixés dans les histiocytes du derme.

Si, chez le rat, une large épilation n'ouvre que de rares portes d'entrée, il n'en est pas de même chez l'homme où les poils n'étant sujets qu'à des mues plus espacées, s'arrachent plus facilement avec le bulbe et où le danger d'infection se trouve singulièrement multiplié quand l'épilation est étendue.

Conclusions. — A l'épilation, les poils du rat se cassent le plus souvent et ne viennent que rarement avec le bulbe. C'est seulement dans ce dernier cas qu'il se produit une petite plaie suffisant à permettre l'entrée des bacilles. Ceux-ci ne pénètrent que dans les canaux vides de poils, se mélangent au sang qui sourd de la lésion et sont emportés par les phagocytes dans l'intimité de l'organisme.

L'ALLERGIE SALIVAIRE HÉMORRAGIQUE

par G. SANARELLI.

(*Institut de microbiologie de l'Université de Rome.*)

I. — Mise au point chronologique sur le phénomène de l'allergie hémorragique.

Le phénomène de l'allergie hémorragique, signalé par nous dès 1916 (1), a été décrit dans tous ses détails expérimentaux — qui n'ont pas varié depuis cette époque — dans notre dernier mémoire concernant la pathogénie du processus cholérique.

Ce mémoire a été publié en 1924 (2).

Nous avons réalisé ce phénomène lors de quelques tentatives expérimentales faites dans le dessein de produire, chez les animaux, des états algides et, surtout, la phase autrefois si mystérieuse, dite algide ou asphyxique, que l'on observe habituellement dans le choléra humain, mais qui peut quelquefois aussi survenir comme une complication très grave dans certaines entérites et certaines appendicites (3).

Nous étions, auparavant, dans l'incompréhension la plus complète sur le mécanisme pathogénique de ces graves syndromes morbides.

A la suite de nombreux essais, nous avons enfin réussi à reproduire par choc, principalement chez les lapins, cette brusque et frappante symptomatologie au cours de laquelle apparaissent des troubles humoraux et circulatoires entraînant des lésions hémorragiques, dégénératives, nécrotiques, etc., atteignant tous les viscères et que, par analogie, nous

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, 6 novembre 1916 et *La Presse Médicale*, 16 novembre 1916.

(2) Ces *Annales*, 1924, p. 237.

(3) *Bull. Acad. Méd. Paris*, 23 octobre 1923.

avons considérée comme entrant dans le cadre symptomatologique et anatomique de l'algidité.

Nous donnâmes alors à ce phénomène le nom d'*épithalaxie*, ce qui signifie *chute des épithéliums*. En effet, la note constante et vraiment caractéristique, non seulement de ce phénomène expérimental, mais aussi de la crise algide du choléra, consiste précisément dans la chute soudaine et massive de tous les épithéliums de revêtement des muqueuses, surtout dans le tube digestif et dans les voies urinaires et biliaires.

C'est pourquoi les auteurs qui, les premiers, ont reproduit nos expériences et étudié le nouveau phénomène que nous avions décrit (4), ont proposé, en raison même de son originalité, de le désigner sous le nom de « phénomène de Sanarelli ».

Ce phénomène qui, selon l'opinion exprimée par A. Gratia et R. Linz (5), partagée par nous (6), semble plutôt s'apparenter à l'allergie qu'à l'anaphylaxie, peut être décrit en peu de mots.

Si l'on injecte dans la veine, ou bien encore dans un organe interne — par exemple dans la paroi de l'appendice — une dose non léthale de microbes (*injection préparante*), puis, environ vingt-quatre heures plus tard, au même animal, toujours par voie intraveineuse, une quantité encore plus petite d'un filtrat bactérien (*injection déchaînante*) on déclenche, ou subitement ou dans un très court délai, un choc extrêmement grave et mortel, accompagné de convulsions et suivi de réactions hémorragiques, dégénératives, humorales, etc., intéressant tous les organes et tissus déjà sensibilisés, directement ou indirectement, par la première injection préparante.

(4) Zdrodowski (P.) et Brenn. *Cent. f. Bakter. Orig.*, **94**, 1925, p. 155. Zdrodowski (P.). Ces *Annales*, 1928, p. 1242. Zdrodowski (P.), Halapine (K.) et Woskressenski (B.). Ces *Annales*, 1931, p. 57.

(5) *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 1080.

(6) Les allergies hémorragiques dans la pathologie humaine et expérimentale. *Schw. mediz. Woch.*, 1935, n° 37, et *Première semaine Médicale Intern. en Suisse*, Montreux, 9-14 septembre 1935. B. Schwabe, Basel, 1936, p. 169.

Il est à remarquer que l'étude de ce phénomène a connu, au cours des années suivantes, nombre de développements expérimentaux et d'interprétations très différentes, surtout en rapport avec la pathogénie de certaines manifestations morbides observées en pathologie humaine : gastro-entéropathies, hépatopathies, ulcérations gastro-duodénales, colites ulcéreuses et hémorragiques, infarctus du grêle et infarctus inexpliqués, appendicites, purpuras, hémorragies des membranes oculaires, glaucomes hémorragiques, néphrites hémorragiques, pancréatites, etc.

Quelques années après les publications de Zdrodowski et Brenn qui, les premiers, avaient étudié et confirmé le phénomène signalé et décrit par nous, en faisant ressortir son importance pathogénique, principalement en ce qui concerne la pathologie digestive, G. Shwartzman, du laboratoire du « Mount-Sinaï Hospital » de New-York, commença, à partir de l'année 1928 (7), à publier des notes sur le même phénomène, qu'il considérait comme « nouveau » et qu'il étudia seulement au point de vue de la réaction cutanée.

Le grand nombre de communications et de variantes expérimentales publiées successivement par G. Shwartzman, toujours sur les manifestations cutanées de notre phénomène, a créé parmi les chercheurs une certaine confusion autour de la vraie paternité scientifique de celui-ci.

De ce fait, un assez grand nombre d'auteurs ont tendance à attribuer, soit partiellement, soit entièrement à G. Shwartzman, la découverte d'un phénomène que nous avons signalé et nettement décrit douze années avant cet auteur.

L'équivoque, qui dure encore, a pu se produire, peut-être, pour ce motif que dans ses communications publiées depuis 1928, G. Shwartzman n'a jamais fait allusion à nos travaux sur le phénomène qu'il présentait comme s'il n'avait pas eu de précédents.

Est-il vraisemblable que, dans le laboratoire du Mount-Sinaï Hospital de New-York, nos travaux aient pu rester ignorés alors qu'ils avaient été publiés depuis de nombreuses

(7) *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **25**, 1928, p. 560.

années déjà, dans les comptes rendus académiques, des revues et périodiques scientifiques parmi les mieux accrédités et les plus répandus dans le monde médical ?

Les savants qui, en Europe, se sont intéressés à la nature de ce phénomène, ont démontré il y a longtemps, que les réactions cutanées décrites par G. Shwartzman, employant la même espèce animale, le lapin, et suivant les mêmes règles expérimentales que nous avons exposées et nettement précisées une douzaine d'années auparavant, sont identifiables au « phénomène de Sanarelli », auquel elles correspondent en tous points (8).

Par conséquent, c'est bien à Sanarelli que doit être attribuée l'exclusive paternité scientifique de la découverte d'un tel phénomène. Sinon nous devrions associer à une telle paternité les noms de tous les auteurs qui, après nous, ont réussi à reproduire et à étudier, en suivant nos directives,

(8) Gratia (A.) et Linz (R.) : « ...Il nous paraît qu'il y a entre les deux phénomènes (de Shwartzman et de Sanarelli) des relations étroites et probablement même identité » (*C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1931, p. 1290). « Nous avons déjà identifié antérieurement le phénomène de Sanarelli au phénomène de Shwartzman » (*Ibid.*, **108**, 1931, p. 238). « Nous croyons donc pouvoir déduire de ces résultats que les phénomènes de Shwartzman et de Sanarelli sont essentiellement identiques, conclusions que nous verrons encore se confirmer dans la suite » (Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 136). P. Bordet : « Le phénomène de Shwartzman n'est, d'ailleurs, qu'une variante du phénomène de Sanarelli » (*C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1931, p. 1253 ; *ibid.*, **114**, 1933, p. 572). G. Debonera, N. Tzortzakis et E. Falchetti : « ...Ce phénomène (de Shwartzman) est très voisin de celui de Sanarelli, sinon le même » (*C. R. Soc. Biol.*, **109**, 1932, p. 24). J. Sabrazès : « Le phénomène de Sanarelli et le phénomène de Shwartzman... sont identiques » (*Gaz. hebdom. Sc. méd. de Bordeaux*, 1932, n° 36, p. 561). A. Alechinsky : « ...L'identité absolue des deux phénomènes est désormais reconnue par tous les auteurs » (*Ann. Igiene*, **45**, 1935, p. 673). M. Gayta : « ...Le phénomène décrit par Shwartzman en 1928 est entièrement analogue à celui décrit par Sanarelli en 1916 » (*Giorn. di Batt. e Imm.*, 1936, p. 506). A. Patania : « Le phénomène de Shwartzman n'est qu'une variété du phénomène décrit par Sanarelli durant ses recherches sur la pathogénie du choléra » (*Riv. Sanit. Sicil.*, 1936, p. 459). S. Minz : « Les récents travaux expérimentaux inspirés des recherches classiques de Sanarelli ont apporté un copieux ensemble de contributions à ce nouveau et vaste chapitre de l'allergie locale, qui est destiné à éclaircir d'une nouvelle lumière une grande quantité de manifestations pathologiques encore aujourd'hui assez obscures ou mal comprises » (*Ann. Igiene*, **46**, 1936, p. 547).

notre phénomène dans les divers organes et tissus de l'organisme.

Ces auteurs sont déjà si nombreux, à l'heure actuelle, qu'il serait très malaisé d'en dresser une liste complète !

Nous rappellerons seulement qu'à la même époque que Shwartzman, ou peu après, de nombreux autres auteurs ont reproduit et décrit, dans la peau des animaux, des réactions allergiques se rapportant au « phénomène de Sanarelli » : M. H. Franklin (9), H. Gross (10), E. Ecker et H. Welch (11), I Freund et E. P. Hosmer (12), F. M. Burnet (13), A. Gratia et R. Linz (14), P. Bordet (15), R. Ibanez Gonzales (16), G. M. Sickles (17), T. Kielanowsky et A. Selzer (18), A. Aléchinsky (19), E. Carlinfanti (20), De Blasio (21), N. Jonkow, Weresnikow, S. A. Jonkin et W. W. Achimowitsch (22), F. Plaut (23), Gratia et Linz (24) l'ont aussi reproduit dans la peau des lapins inoculés avec le vaccin charbonneux, avec le virus-vaccin, avec le neuro-vaccin et avec le virus rabique. K. Apitz (25) a répété les expériences originales communiquées par Sanarelli à l'Académie des Sciences de Paris en 1916 et les a pleinement confirmées. D'autres auteurs : F. M. Burnet (26) déjà nommé, A. Cohn (27), E. Cope et K. Ho-

(9) *Proc. Soc. exper. Biol. and Medicine*, 1931, p. 319.
(10) *Cent. für Bakter. Orig.*, **122**, 1931, p. 96.
(11) *J. Experim. Medic.*, 1930, p. 409.
(12) *J. Imm.*, **29**, 1935, p. 279.
(13) *J. Path. and Bact.*, 1931, p. 45.
(14) Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 131.
(15) *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 1251 ; **107**, p. 622 et 1465 ; **114**, 1933, p. 572 et 574.
(16) *Rev. San. e Hyg. Publica*, 1932, p. 345.
(17) *J. Imm.*, **20**, 1931, p. 169.
(18) *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 1140.
(19) *Ibid.*, **118**, 1935, p. 1496 et **119**, p. 1199 ; **121**, 1936, p. 166
(20) *Ann. Igiene*, 1935, p. 817.
(21) *Gior. di Batt. e Imm.*, 1937, p. 113.
(22) *Vestnik Mikrobiol. Epid. i Parasit.*, **15**, n° 3-4, 1936-1937.
(23) *Zeits. f. Imm.*, **87**, 1934,
(24) Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 131.
(25) *J. Imm.*, **29**, n° 3, 1935, p. 255.
(26) *Loc. cit.*
(27) *Klin. Woch.*, 1934, p. 452.

well (28), E. M. Klein (29), Cohen (30), A. Saenz et L. Costil (31), C. F. Cerruti (32), E. Gentile (33), Hanger (34), M. Aitoff, M. Dion et H. Dobkevitch (35), A. Alechinsky (36), L. Michelazzi (37), P. Boquet (38), T. Morimoto (39), Watanabe et Misumi (40), H. Bock (41), H. M. Powell et W. A. Jaimeson (42), E. J. Cope et K. Howell (43), etc., ont obtenu le phénomène en employant comme antigènes préparants ou déchaînants des filtrats, des lysats, des nucléoprotéides, etc., obtenus à partir des souches microbiennes les plus variées, aérobies ou anaérobies : *B. coli*, B. typhiques, *Pasteurella*, *Brucella*, Gonocoques, Méningocoques, *B. bronchisepticus*, *B. pullorum*, *B. avisepticus*, *B. enteritidis* (Gärtner), B. dysentériques des nouveau-nés, vieilles cultures de staphylocoques, Saccharomycètes, Pneumocoques dissous dans la bile, etc.

D'autre part, S. M. Peck et H. Sobotha (44) ont obtenu les mêmes résultats à partir du venin de serpents ; M. Nasta (45) a employé la tuberculine ; Zdrodowski (46), le lait et l'albumine d'œuf ; P. Tinozzi (47), le catgut ; G. Fiorito (48), l'essence de térébenthine ; T. Giuffré (49) en bloquant le système

(28) *J. Infect. Diseases*, **48**, 1931, p. 570.
(29) *J. Experim. Med.*, **56**, 1932, p. 312.
(30) *J. Infect. Diseases*, **52**, 1931, p. 155.
(31) *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 573.
(32) *Gior. Batt. e Imm.*, 1937, p. 55.
(33) *Ibid.*, 1934, p. 1030 et 1045.
(34) *Proc. Soc. Experim. Biol. and Med.*, **25**, 1928, p. 775.
(35) *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 884.
(36) *Ibid.*, **123**, 1936, p. 148.
(37) *Pathologica*, 1935, p. 662.
(38) *C. R. Soc de Biol.*, **119**, 1935, p. 56.
(39) *Nagasaki Igakkwai Zassi*, **13**, n° 5, 1935.
(40) *J. Japan. Soc. of Vet. Sc.*, Mars 1935.
(41) *Cent. f. Bakter.*, **125**, 1932, p. 435.
(42) *J. Imm.*, **23**, 1932, p. 481.
(43) *J. Infect. Diseases*, **48**, 1931, p. 570.
(44) *J. Exp. Medic.*, 1931, p. 407.
(45) *C. R. Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1307.
(46) Ces *Annales*, 1928, p. 1242.
(47) *Boll. Soc. di Scienze med. di Bologna*, 1937, p. 98.
(48) *Gior. Batt. e Imm.*, **11**, 1933, p. 616.
(49) *Pathologica*, **29**, 1937, p. 553.

réticulo-endothélial ; V. Vanni (50) en employant le liquide cœlomatique d'ascarides, etc.

Selon M. Gayta (51), L. Semmola (52), M. Watanabe et K. Misumi, cités précédemment, il semblerait cependant que seraient peu aptes à reproduire le phénomène de l'allergie hémorragique, ou en seraient totalement incapables : les filtrats de cultures diphtériques et l'antitoxine diphtérique, ainsi que les filtrats de *B. putrificus*, *B. tetani*, *B. mallei*, *B. welchii*, *B. botulinus*, *B. abortus* Bang, *B. anthracis*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, etc.

Quant aux auteurs qui ont réussi à reproduire le phénomène dans des organes déterminés, ils sont maintenant si nombreux qu'il serait sans doute difficile de les nommer tous. A. Gratia et R. Linz (53) ont reproduit le phénomène dans les poumons, dans le péritoine, l'intestin et le rein ; A. R. Moritz et J. D. Morley (54) dans les articulations ; N. Cassuto (55), F. Amantea (56), G. Mossa (57), F. Fabiani et A Gauthier (58), dans l'œil et les annexes oculaires ; H T. Karsner, E. E. Ecker et E. L. Jackson (59) dans la muqueuse gastrique ; Ibanez Gonzales (60) dans le testicule ; R. Reitano et L. Loi (61) dans le pancréas ; G. Dessy (62) dans les reins ; O. B. Bier (63) dans l'oreille ; A. Alechinsky (64) dans une région capillaire de la peau ; P. Gritti (65) dans la muqueuse

(50) *Atti dell'Acc. Lancisiana di Roma*, n° 1, 1938 et *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 17 décembre 1938, p. 1052.
(51) *Gior. Batt. e Imm.*, 1936, p. 505.
(52) *Ibid.*, 1936, p. 517.
(53) *Loc. cit.*
(54) *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1931, p. 321.
(55) *Lo Sperimentale*, 1933, p. 191.
(56) *Ann. Igiene*, 1935, p. 538.
(57) *Boll. Ocul.*, **14**, 1935, p. 1031.
(58) *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 51.
(59) *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **29**, 1931, p. 319.
(60) *Loc. cit.*
(61) *Boll. Soc. Ital. di Biolog. sperim.*, 1934, p. 126.
(62) *La Diagnosi*, 1936, p. 249.
(63) *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 407.
(64) *Ibid.*, **118**, 1935, p. 1496.
(65) *Valsalva*, **12**, n° 4, 1936.

nasale ; M. Fried (66) dans les poumons ; A. Patania (67) dans la rate ; K. Apitz (68) dans le foie, le cœur et la rate ; Gronchi (69) dans les surrénales ; A. Guarna (70) dans l'utérus, les ovaires et le vagin ; S. Latteri (71) dans l'appendice ; Loi et Carolia (72) dans le rein énervé ; L. Michelazzi (73) sur les lapins tuberculisés et sur des cobayes en proie à une infection staphylococcique ; L. Barchi (74) sur des sujets tuberculeux, en employant le sérum de paludéens, etc.

Si l'on tient compte du grand nombre de savants qui, de 1925 à ce jour, se sont occupés, d'une manière ou d'une autre, du phénomène par nous signalé, étudié et décrit depuis l'année 1916, comment semble-t-il possible d'attacher à ce phénomène, ou à ses nombreuses variantes, des dénominations aussi diverses que les noms de tous ces auteurs, sans tomber aussitôt dans la confusion ?

II — Coup d'œil sur la biologie de la flore bactérienne de la cavité orale.

Dans un récent article (75) nous avons publié des recherches concernant la prémunition aspécifique des entéropathies expérimentales de nature microbienne.

En poursuivant ces recherches nous avons eu, entre autres, l'opportunité de mettre en évidence une réaction biologique particulière qui, par maints aspects nous a semblé nouvelle, quoique pouvant être rapportée au phénomène de l'allergie hémorragique qui porte aujourd'hui notre nom. Nous avons voulu l'étudier un peu à fond.

Elle s'était révélée à nous par hasard.

(66) *Arch. of Path.*, décembre 1934, p. 1032.
(67) *Riv. Sanit. Sicil.*, 1936, p. 450.
(68) *Virchow's Archiv.*, **293**, 1934, p. 1.
(69) *Boll. Soc. Ital. di Biol. sperim.*, 1934, p. 1032.
(70) *Boll. Ist. Sierot. Milan.*, **14**, 1935, p. 360.
(71) *Boll. Soc. Ital. di Biol. sperim.*, 1934, p. 877.
(72) *Ibid.*, 1934, p. 775.
(73) *Boll. Ist. Sier. Milanese*, **14**, 1935, p. 105 et *Gior. di Batt. e Imm.*, **14**, 1935, p. 1212 et 1226.
(74) *Gior. di Clin. Medica*, **16**, 1935, p. 1318.
(75) *La Presse Médicale*, 1937, p. 1819.

Nous avions décidé d'essayer l'action prémunissante ou curative d'une anaentérotoxine aspécifique dans certaines entéropathies provoquées chez les lapins.

Dans le but d'obtenir chez ces animaux des entéropathies chroniques nous avions, tout d'abord, eu recours à des injections intraveineuses de microbes pathogènes choisis parmi les plus communs, notoirement entérotropes : *B coli*, Bacille de la dysenterie, Vibrions cholériques et Bacilles paratyphiques.

Mais les injections intraveineuses ou sous-cutanées de ces bacilles, vivants ou morts, quoique pratiquées avec des précautions particulières et à petites doses, produisaient bien, chez les lapins, des entéropathies dues à une localisation entérique des bactéries injectées ou de leurs protéines ; mais, en même temps, elles se révélaient trop toxiques. A la longue, les animaux finissaient par succomber, non seulement par suite des troubles progressifs des fonctions du tube digestif, mais aussi par l'effet d'une lente intoxication de nature protéique.

Afin de mieux localiser le processus pathologique intestinal auquel nous voulions, avant tout, nous tenir, nous décidâmes de recourir à un nouveau procédé expérimental, qui nous était suggéré par une opinion que nous nous étions formée depuis longtemps concernant la nature et la pathogénie des entéropathies microbiennes, aussi bien aiguës que chroniques.

Nous avons été toujours d'avis que les entéropathies sont, pour la plupart, d'origine hématique et que leurs agents pathogènes ont, comme porte d'entrée et comme point de départ pour l'invasion circulatoire, la cavité buccale et ses formations lymphatiques (76).

Renonçant, dès lors, à l'emploi des microbes spécifiques entérotropes précédemment indiqués, parce que trop toxigènes et non appropriés à des animaux relativement peu résistants comme les lapins, nous décidâmes de recourir à l'action de la flore bactérienne normale de la cavité buccale.

(76) G. Sanarelli : *Les entéropathies microbiennes*. Ed. Masson, Paris, 1926, p. 172.

Nous pensons que ce sont précisément ces bactéries, commensales habituelles de notre cavité orale qui, de la bouche, pénètrent dans la circulation beaucoup plus fréquemment qu'on ne le pense, en engendrant des bactériémies et des entéropathies. Par voie sanguine elles vont électivement s'implanter dans les parois des différentes portions du tube digestif, en donnant naissance à des manifestations entéropathiques aiguës ou chroniques qui, selon les cas, peuvent ensuite assumer les caractères les plus divers : inflammatoire, hémorragique, purulent, ulcéreux, infiltrant, plastique, sténosant, etc., etc.

La flore microbienne de la cavité buccale et de la salive est suffisamment connue.

Ainsi que nous l'avions déjà signalé dans un récent article (77), la flore buccale est constituée par une grande variété de bactéries et de spirochètes, généralement non cultivables sur les milieux nutritifs ordinairement employés pour le développement des microbes aérobies.

La flore de la cavité orale est caractéristique et permanente.

Mais les cultures d'isolement sur ces milieux révèlent aussi dans la salive, la présence de quelques espèces microbiennes aérobies cultivables : des microcoques et, surtout, des variétés de streptocoques qui sont toujours en grand nombre ; les uns et les autres peu virulents pour les animaux de laboratoire.

De notre salive mixte que nous avons toujours employée pour ces expériences, nous avons parfois isolé aussi, par inoculation à des souris, le pneumocoque. Mais la mort de ces petits animaux survenait entre quatre et six jours, ce qui signifiait que notre pneumocoque salivaire était peu virulent. En fait, les injections de notre salive faites sous la peau de lapins, ne produisaient jamais la septicémie pneumococcique.

Mais si les cultures de notre salive pouvaient faire supposer une pauvreté relative en bactéries, son examen microscopique révélait, au contraire, la présence d'une infinité de

(77) G. Sanarelli : Les cacosmies buccales. *Presse Médicale*, 1er octobre 1938, p. 1449.

microbes de toutes formes et de toutes dimensions, pour la plupart réunis en pelotons très épais et en amas denses.

Si l'on soumet à une observation périodique, durant plusieurs jours de suite, la salive récoltée en tubes stériles et maintenue à l'étuve ou à la température du laboratoire, on en retire cette impression que, *in vitro*, le développement de cette flore salivaire extrêmement variée est nul.

La réaction alcaline du milieu ne se modifie pas et tous les éléments figurés : leucocytes polynucléaires neutrophiles, cellules épithéliales et amas bactériens se déposent peu à peu au fond du tube, tandis que le liquide surnageant devient de plus en plus limpide. La salive, pour cette raison, se conserve dans les tubes même durant plusieurs mois, sans jamais se troubler, s'altérer ou dégager une odeur quelconque.

Cela confirme une fois de plus nos anciennes expériences (78) où nous avions démontré pour la première fois l'action bactéricide, atténuante et inhibitrice du liquide salivaire sur toutes les espèces bactériennes, y compris le bacille diphtérique, ce qui, à l'époque, parut à peine croyable.

Ces recherches ont été, cependant, successivement confirmées — quoique, pour la plupart, publiées comme entièrement nouvelles ! — par un grand nombre d'auteurs : H. Dold et F. Weigman (79), K. W. Clauberg (80), K. L. Pesch et R. Damm (81), M. T. Casassa (82), etc. Comme cela arrive souvent, ces savants ont totalement ignoré, dans leurs mémoires, les recherches effectuées et publiées par nous de nombreuses années auparavant !

Récemment, Piasecka-Zeyland et J. Zeyland (83) ont démontré l'existence d'un pouvoir inhibiteur de la salive, même sur le développement des bacilles tuberculeux.

A ces substances inhibitrices de la salive, quelques auteurs ont voulu donner le nom d'« inhibines ».

(78) *Cent. f. Bakt.*, **10**, 1892, p. 817.
(79) *Zeits. f. Hyg.*, **106**, 1934, p. 158.
(80) *Cent. f. Bakt.*, **134**, 1935, p. 96.
(81) *Zeits. f. Hyg.*, **118**, 1936, p. 1.
(82) *Gior. di Batt. e Imm.*, **18**, 1937, p. 381.
(83) *Tubercle*, **19**, 1937, p. 24.

Tout cela étant admis, comment peut-on expliquer la présence de cette énorme quantité de bactéries qu'on aperçoit dans la salive, lorsqu'on l'examine directement au microscope ?

Nous avons observé au microscope, pendant plusieurs jours de suite, les éléments cellulaires, surtout les grandes cellules épithéliales provenant de l'exfoliation de la muqueuse buccale qui, peu à peu, sédimentent et se réunissent au fond d'un tube rempli de salive, maintenu à la température ambiante. En colorant les préparations, au Giemsa ou au May-Grünwald, ou avec une autre couleur quelconque d'aniline assez diluée, on s'aperçoit que le protoplasme des cellules épithéliales est toujours chargé d'une grande quantité de bactéries.

Mais si l'on examine attentivement, on voit que ces bactéries ne se trouvent pas à l'intérieur du protoplasme cellulaire. Elles sont simplement fixées et disposées à sa surface. De nombreuses cellules apparaissent complètement recouvertes d'épaisses stratifications bactériennes, tout à fait uniformes, ce qui conduit à penser que la multiplication des bactéries s'est produite *in situ*, c'est-à-dire au-dessus du protoplasme cellulaire.

En répétant périodiquement ces examens, on observera également que, au fur et à mesure que le temps s'écoule, la surface des cellules épithéliales bactérifères s'enrichit progressivement en bactéries, jusqu'à en être totalement recouverte, tandis que le liquide salivaire qui surnage devient de plus en plus limpide et, microscopiquement, quasi amicrobien.

Il en faut retenir que la quantité démesurée de bactéries, de spirilles et de spirochètes qui pullulent dans la muqueuse buccale et qu'on ne réussit pas à cultiver sur les milieux ordinairement employés pour les aérobies, est constituée par des germes plus ou moins strictement anaérobies qui, à la manière des microbes cytotropes, vivent et se multiplient seulement au contact immédiat des cellules mortes et de leurs déchets.

Ces derniers leur offrent le milieu nutritif, le *pabulum* nécessaire à la satisfaction de leurs exigences vitales particu-

lières de microbes anaérobies, comme le serait le milieu bien connu de Tarozzi, qui est précisément employé pour la culture des anaérobies.

Les microbes anaérobies de la bouche n'étant pas en mesure d'utiliser pour leurs propres besoins l'oxygène moléculaire, utilisent l'oxygène atomique déjà fixé sur des substances organiques mortes. Il est à noter que ces dernières, en présence de l'air, fixent continuellement de l'oxygène. Les exigences biologiques de ces microbes sont donc très analogues à celles des spirochètes, germes semi-anaérobies vivant dans l'intestin et dans la bouche, étudiés par nous il y a quelques années (84).

Ainsi s explique comment se produit dans la cavité buccale — milieu largement aéré — cette multiplication prodigieuse et extrêmement rapide de bactéries qu'on a toujours occasion de constater chaque fois que — ce que nous avons pu faire souvent — les examens microscopiques de la salive sont pratiqués même très peu de temps après un nettoyage et un rinçage extrêmement soignés de la bouche et des dents.

Ces observations microscopiques sur le développement des bactéries anaérobies de la cavité orale réussissent moins bien si la salive a été conservée à l'étuve à 37°, parce qu'à cette température tous les éléments cellulaires s'altèrent rapidement, se transforment en détritus et ne permettent plus d'effectuer des préparations microscopiques démonstratives.

Quant aux microbes aérobies présents dans la salive gardée dans les tubes, ils deviennent de plus en plus rares à mesure que le temps s'écoule et, enfin, ils disparaissent par suite de l'action autoépuratrice due au pouvoir bactéricide du milieu salivaire.

Toute cette flore salivaire extrêmement variée et typique est cependant, du point de vue biologique, assez fragile.

Elle est détruite en une demi-heure à 60-70°.

Dans les tubes de bouillon que nous employons toujours pour les contrôles de la stérilisation, il nous arrive parfois d'observer le développement de quelque souche de *B. mesente-*

(84) Ces *Annales*, **41**, 1927, p. 1 et 679.

ricus qui se révèle vite par l'apparition du voile superficiel caractéristique. Mais il s'agit là de constatations tout à fait exceptionnelles qui surviennent généralement après l'usage alimentaire de pommes de terre.

Pour recueillir la quantité de salive nécessaire à nos expériences, nous avons toujours procédé de la manière suivante :

Le soir, avant de nous coucher, nous procédions à un nettoyage soigné de la bouche au moyen d'une brosse à dents et en nous rinçant ensuite à plusieurs reprises avec de l'eau bouillie. Le lendemain matin, jusque vers midi, la salive était recueillie dans un crachoir de verre approprié, transportable et stérilisé. Avec un peu de patience, on réussit facilement à recueillir dans le cours de la matinée, environ 50-60 cent. cubes de salive mixte intégrale, à réaction légèrement alcaline. Si l'on veut, on peut recueillir une autre quantité de salive dans le cours de l'après-midi. La salive ainsi obtenue est versée dans des matras ou dans des tubes que l'on conserve à la glacière.

Maintenue au repos, notre salive, comme du reste toute salive mixte, intégrale, se sépare en une couche supérieure limpide ou à peine opalescente et en une couche inférieure trouble, d'un blanc jaunâtre, formée par un dépôt de mucosités floconneuses, de cellules épithéliales de la bouche et de corpuscules dits salivaires, lesquels ne sont que des leucocytes et, plus précisément, des granulocytes.

La composition de notre salive mixte apparaît à un examen sommaire, tout à fait semblable à celle d'une salive quelconque, provenant d'un sujet normal, à denture saine. Son poids spécifique est, en fait, normal, c'est-à-dire d'environ 1 000. Sa teneur en matières organiques est de 3,84 p. 100, c'est-à-dire peu inférieure aux 4 p. 100 indiqués dans les traités de physiologie (85). La quantité de matière organique de notre salive décantée après sédimentation spontanée de tous ses éléments morphologiques, s'établit à 2,4 p. 100.

(85) ROGER (H.) et BINET (L.). *Traité de Physiologie normale et pathologique*, **2**, 1931, p. 102.

III. — Effets des injections intraveineuses de salive naturelle et de salive stérilisée.

Après ces recherches préliminaires sur notre salive, nous avons procédé à l'expérimentation concernant son action sur les animaux.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, nos expériences avaient, tout d'abord, pour seul but de provoquer chez les lapins, au moyen d'injections salivaires intraveineuses, des entéropathies susceptibles de devenir chroniques.

Il est bien entendu que pour obtenir un tel résultat, on ne peut pas employer la salive naturelle.

Chez nos lapins, d'un poids moyen de 1.600-1.900 grammes, les injections intraveineuses, à dose convenable, de notre salive fraîche et non stérilisée, produisent habituellement une septicémie streptococcique. Les injections faibles, de quelques centimètres cubes, sont presque sans effet. Chez les lapins de plus forte taille, les injections de salive, jusqu'à 5 cent. cubes ne produisent, le plus souvent, que des diminutions transitoires du poids. Les animaux finissent, pour la plupart, par surmonter l'infection.

Mais si la même dose de 5 cent. cubes est injectée dans les veines de lapins de poids moindre (de 1.300 à 1.400 grammes), ceux-ci meurent de septicémie streptococcique, souvent en moins de vingt-quatre heures. Une issue analogue survient lorsque les lapins de plus grande taille reçoivent des doses s'élevant jusqu'à 10 cent. cubes ou si, chez ces mêmes gros lapins, la dose de 5 cent. cubes est injectée dans les veines pendant deux jours consécutifs. Dans ces cas aussi les lapins meurent de septicémie, dans un délai de douze à quinze jours. Si l'injection de 5 cent. cubes de salive est répétée durant quatre jours consécutifs, les lapins meurent au bout de huit à neuf jours. Dans tous ces cas la culture du sang et des divers organes montra que la mort des animaux était due à une septicémie streptococcique.

Ces expériences avaient démontré, entre autres, que les streptocoques de la salive normale isolés en culture pure

étaient peu pathogènes pour les animaux, même injectés à fortes doses. Toutefois, lorsqu'ils étaient injectés dans les veines en même temps que la salive, ils manifestaient une activité pathogène plus accentuée, provoquant aussi de la néphrite. Dans ce cas, l'urine est plus ou moins albumineuse.

Ayant dû renoncer, pour ce motif, à l'emploi de la salive naturelle, nous avons fait usage de la salive stérilisée par chauffage durant une heure à la température de 60°, au bain-marie.

C'est pourquoi, toutes les fois que dorénavant nous aurons l'occasion de faire allusion aux injections de salive ou de parler de salive inactivée, il devra être entendu qu'il s'agit toujours de salive rendue stérile de la manière qui vient d'être décrite.

Nous avons voulu, avant tout, expérimenter les injections intraveineuses de liquide salivaire décanté, c'est-à-dire du liquide transparent, optiquement quasi amicrobien, qui peut être aspiré des tubes laissés au repos durant quelques jours. Au fond de ces tubes, il se forme un dépôt qui est formé de bactéries et d'éléments ou de détritus cellulaires.

Les injections de salive d'abord stérilisée, puis décantée, sont très bien tolérées par les animaux.

Dans les veines auriculaires d'un lapin de 1.700 grammes (n° 11), nous avons réussi, du 13 au 25 février, à injecter chaque jour 10 cent. cubes de liquide salivaire décanté stérile. Dans l'espace de treize jours, nous avons donc injecté au total 130 cent. cubes.

Or, au 25 février, le lapin ainsi traité pesait encore 1.700 grammes, c'est-à-dire qu'il avait le même poids qu'au premier jour de l'expérience ! Il pouvait donc servir, ainsi que nous le verrons plus loin, pour d'autres usages.

Ces recherches préliminaires ont donc montré que la salive mixte, inactivée à 60° et privée par décantation spontanée de tous ses éléments morphologiques, et par suite de ses bactéries, demeure inoffensive même lorsqu'elle est introduite dans les veines en quantité élevée et durant un grand nombre de jours consécutifs.

D'une manière bien différente agissent les injections intra-

veineuses de salive stérilisée et non décantée, préalablement agitée dans les tubes de manière à émulsionner d'une façon homogène tout le sédiment.

Les injections isolées de 5 et de 10 cent. cubes de cette salive ne produisent, chez les lapins, que des variations pondérales transitoires, de courte durée. En fait, huit à dix jours après ces injections, les animaux ont ordinairement déjà recouvré leur poids.

Même si les injections de 5 cent. cubes de salive sont répétées durant cinq à six jours de suite, surtout lorsqu'on emploie des lapins d'une certaine taille, on n'observe que des variations pondérales faibles et transitoires. Les animaux finissent, en quelque sorte, par tolérer ces injections. Après quelques jours de repos, il n'y a plus qu'à recommencer ! Il est probable que l'organisme a la possibilité d'éliminer, peu à peu, par ses émonctoires naturels, et principalement par l'intestin, les bactéries salivaires et les détritus cellulaires, pourvu que ces éléments étrangers soient introduits dans la circulation, même pendant un temps assez prolongé, à doses petites et fractionnées.

Toutefois, si l'on élève un peu ces doses et si, chez des lapins du poids moyen de 1.700 à 1.750 grammes, on introduit dans les veines, par exemple : le premier jour 10 cent. cubes et le jour suivant, 5 à 10 cent. cubes de salive, on observe une rapide diminution du poids du corps, diminution qui va en s'accentuant progressivement dans les jours suivants et qui finit par entraîner la mort par marasme.

Si la seconde injection salivaire a été seulement de 5 cent. cubes, la mort ne survient qu'en trente, quarante et même cinquante jours. Lorsque la seconde injection est de 10 cent. cubes, la mort se produit dans un délai plus court, environ vingt jours. Cependant, si les lapins sont de forte taille, par exemple de 1.900 à 2.000 grammes, ils peuvent aussi survivre. Le poids des animaux employés influe beaucoup sur le résultat de ces expériences.

Les altérations que l'on peut relever à l'autopsie, surtout dans les cas de plus longue survie, sont toujours celles d'une cachexie gastro-intestinale avancée. Le péritoine contient habituellement une abon-

dante sérosité. Les anses intestinales, surtout dans le segment duodénal, apparaissent diarrhéiques, avec parois amincies, quasi transparentes et atrophiées, avec un calibre fortement réduit. Le cæcum est réduit de volume, de même que l'estomac. La muqueuse de l'estomac est assez rouge et recouverte d'une épaisse couche de mucosité catarrhale. Son contenu semi-fluide reste cependant très acide. La rate est toujours atrophiée. Le foie, les reins et les poumons conservent leur aspect normal. La vessie renferme toujours une grande quantité d'urine alcaline, souvent albumineuse. Les cultures du sang et de tous les organes restent constamment stériles.

De cette manière nous avons, finalement, réussi à produire chez nos lapins des gastro-entéropathies salivaires chroniques de nature probablement protéique.

Nous verrons ultérieurement comment nous avons utilisé ce procédé expérimental pour essayer dans les entéropathies chroniques expérimentales l'action prémunissante et même curative d'une anaentérotoxine aspécifique, à laquelle nous avons fait allusion dans une précédente étude, mentionnée plus haut (86).

IV. — L'ALLERGIE SALIVAIRE HÉMORRAGIQUE.

Arrivons enfin à la description de la nouvelle réaction allergique de nature salivaire que, au cours de ces expériences, il nous a été donné de reproduire chez les lapins.

Durant nos nombreuses tentatives qui, comme nous l'avons déjà dit, avaient surtout pour but d'essayer et de préciser l'action de la salive injectée par diverses voies à des animaux, nous avions constaté que les injections de salive inactivée, bien que faites à doses élevées — par exemple 10 cent. cubes — et répétées pendant de nombreux jours consécutifs, étaient bien tolérées. Mais à la condition qu'elles fussent pratiquées dans la cavité péritonéale ou sous la peau.

La raison d'une aussi grande tolérance, spécialement de la part du péritoine, est facile à trouver.

Si l'on fait l'autopsie d'un lapin ayant reçu pendant de nombreux jours, des injections de salive dans le péritoine, on observe que tous les éléments morphologiques du matériel

(86) *Presse Médic.*, 1937, p. 1821.

injecté : cellules, détritus et bactéries se présentent en amas sous forme de lambeaux et de petits blocs de couleur jaunâtre, disséminés çà et là et adhérant aux anses intestinales, aux plis de l'épiploon et aux parois mêmes de l'abdomen.

L'examen microscopique de ces petits blocs d'aspect fibrino-purulent, révèle qu'ils sont constitués par des amas cellulaires et bactériens provenant de la salive injectée.

Ce fait correspond point pour point aux réactions de défense bien connues qui se produisent dans le péritoine, lorsqu'on introduit des bactéries et des éléments étrangers dans la cavité abdominale (87). En conclusion, les bactéries salivaires mortes, injectées dans le péritoine, ne sont pas absorbées tout de suite mais sont pour la plupart séquestrées et bloquées en attendant d'être, peu à peu, éliminées par l'intervention des macrophages.

Par contre, si les injections de salive sont pratiquées dans les veines et répétées à peu près à la même heure, *durant trois jours consécutifs*, à la dose de 10 cent. cubes, elles déchaînent brusquement, très peu de temps après la dernière injection, un *choc* violent se manifestant sous forme de crise convulsive, de cris, de polypnée, d'élimination urinaire, etc., et qui se termine invariablement par la mort.

L'autopsie de ces animaux fournit des données caractéristiques. Dans le plus grand nombre de cas, on constate, à l'ouverture de la cavité péritonéale, la présence d'une abondante sérosité généralement hématique, s'élevant souvent à plus de 10 cent. cubes. Souvent aussi, on y rencontre du sang fluide dans lequel on peut récolter de gros coagulums sanguins. Il s'agit là de véritables cas d'hémorragies péritonéales. D'un lapin mort aussitôt après la troisième injection, nous avons pu extraire de la cavité abdominale environ 45 cent. cubes de sang liquide et un coagulum pesant 17 grammes !

Il est difficile de relever avec précision quelle peut être, dans ces cas, l'origine exacte des petites comme des fortes hémorragies péritonéales. Mais on peut bien supposer que le sang provient généralement de veines dilatées, ou même déchirées, de l'épiploon.

De fait, dans ces cas où, à l'autopsie, on rencontre seule-

(87) G. Sanarelli. Ces *Annales*, 1919, p. 837.

ment de la sérosité plus ou moins hématique, on observe que tout le système veineux abdominal est énormément dilaté et congestionné. Mais l'organe qui semble, de beaucoup, le plus congestionné, est presque toujours l'épiploon dont les veines ont, comme cela est bien connu, des parois d'une extrême finesse et d'une grande fragilité.

Lorsqu'on se trouve en présence d'une péritonite hémorragique, tous les organes apparaissent anémiques et quasi exsangues.

Les ruptures des parois vasculaires sont causées et favorisées par cette dilatation exagérée que provoque l'afflux sanguin, ainsi que par les processus dégénératifs et nécrotiques subitement déclenchés par les soudaines altérations humorales et tissulaires qui sont l'effet du *choc* allergique provoqué par la dernière injection intraveineuse déchaînante.

C'est pourquoi les auteurs qui ont étudié les lésions histopathologiques qu'on observe sur les organes des lapins chez lesquels on a provoqué le « phénomène de Sanarelli » : H. T. Karsner et A. N. Moritz (88), T. Kielanowski et A. Selzer (89), etc., affirment que, dans ces cas, les injections déchaînantes produisent de graves lésions vasculaires et hémorragiques, ruptures de vaisseaux, etc., à cause de l'excessive congestion sanguine, provoquée par une sorte de biotropisme spécifique. Cela est si exact que lors d'expériences effectuées sur la peau, les phénomènes congestifs peuvent être arrêtés par l'application locale d'agents anémiants.

Ces hémorragies péritonéales, qui représentent les résultats habituels des allergies salivaires et qu'on peut, en tout et pour tout, rapporter au « phénomène de Sanarelli », s'accompagnent d'autres lésions de même nature qu'on peut relever dans d'autres organes.

De telles lésions — bien entendu lorsque l'hémorragie péritonéale n'a pas causé l'évacuation du sang de tous les viscères — sont généralement les suivantes : toutes les anses intestinales apparaissent énormément congestionnées et diarrhéiques ; elles présentent la couleur hortensia, bien connue. L'appendice présente également la même

(88) *J. Exp. Medic.*, **60**, 1934, p. 37.
(89) *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 1140.

couleur et la même vascularisation intense. La portion duodénale apparaît toujours la plus congestionnée et la plus diarrhéique. Les veines gastriques sont, aussi, très congestionnées et dilatées. Le foie, également, est congestionné, mais la rate, au contraire, présente toujours un aspect normal. L'épiploon est presque toujours si congestionné qu'il ressemble à une grosse nodosité de vaisseaux sanguins variqueux. Le mésentère est pareillement vascularisé d'une manière extraordinaire. Les deux cornes de l'utérus sont fortement rougies et leur muqueuse présente une teinte lie de vin et, parfois, est franchement hémorragique. Les reins se présentent un peu congestionnés. La vessie est habituellement contractée et ne contient que quelques gouttes d'urine dont la réaction est alcaline et qui, le plus souvent, ne renferme pas d'albumine.

Des suffusions et infiltrations hémorragiques très caractéristiques et parfois importantes s'observent dans la région lombo-sacrée, le long des deux grands muscles psoas. Dans un cas, l'infiltration hémorragique des muscles psoas avait atteint de si vastes proportions que nous décidâmes de faire des préparations microscopiques. L'examen des coupes révéla une forte infiltration hémorragique sous-péritonéale s'étendant presque au long du muscle tout entier et s'insinuant à travers l'aponévrose lombo-iliaque et les fibres musculaires. L'hémorragie n'était pas libre, mais le sang s'était frayé un chemin à travers les mailles du tissu conjonctif sous-aponévrotique dont les fibres apparaissent fort dissociées. Dans les coupes montées et colorées, la notable épaisseur de l'infiltration hémorragique était très nettement visible, même à l'œil nu.

Mais, à part la gravité et l'importance de ces hémorragies, les lésions vraiment particulières à ces crises allergiques mortelles sont celles qu'on observe dans les poumons.

Ces organes apparaissent presque toujours plutôt anémiés que congestionnés, ce qui fait encore mieux ressortir la présence de taches lenticulaires hémorragiques qui sont plus ou moins abondamment disséminées dans ces organes. De telles pétéchies, qui sont tout à fait semblables à celles que nous avons décrites aussi dans les poumons des cobayes ayant succombé à l'infection spirochétienne (90), sont comparables à ces taches lenticulaires qu'on observe sur les ailes des papillons du genre « vanessa ». Dans notre mémoire « Sur la pathogénie des spirochétoses ictérogènes » présenté au IIIe Congrès International de Pathologie comparée, nous avons

(90) G. Sanarelli. Ces *Annales*, **43**, 1929, p. 109.

démontré que les pétéchies pulmonaires spirochétiennes sont aussi de nature allergique (91).

Dans certains cas, le nombre de ces pétéchies pulmonaires n'est pas très élevé, mais chez certains lapins, elles sont tellement abondantes que la surface des deux poumons en est intensément parsemée (voir fig. 1).

Nous n'avons jamais rien vu de semblable dans aucune autre infection expérimentale. Egalement, dans l'allergie hémorragique ou épithalaxie, provoquée chez les lapins qui suc-



Fig. 1. — Pétéchies lenticulaires dans les poumons d'un lapin mort à la suite d'une crise allergique salivaire hémorragique.

succombent par suite du « phénomène de Sanarelli » (92), on ne constate rien de semblable.

L'examen microscopique des coupes de poumons, fixées dans le formol et colorées avec l'hématoxyline-éosine, montre que les pétéchies correspondent à des hémorragies qui occupent des zones plus ou moins étendues de tissu pulmonaire.

(91) G. Sanarelli. *C. R. III^e Congrès Intern. Path. comparée*. Athènes, vol. **1**, 1936, p. 197.

(92) G. Sanarelli. Ces *Annales*, **38**, 1924, p. 11.

On aperçoit des groupes d'alvéoles inondés de sang. En certains points, les parois alvéolaires apparaissent comme déchirées, tandis que le sang se fraye un chemin en s'infiltrant dans de vastes secteurs du parenchyme pulmonaire, formant ainsi des lacs sanguins très étendus.

A titre d'exemple et pour mieux fixer la physionomie de ces résultats, nous donnons ci-dessous le résumé de quelques protocoles de laboratoire, choisis parmi les plus intéressants.

I. Lapin ♂, n° 52, de 1.620 grammes.

17 février 1938, 10 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

18 février 1938, 10 heures. Même injection.

19 février 1938, 10 heures. Même injection.

Peu après cette dernière injection, l'animal est pris de convulsions, de polypnée et d'apnée. La mort survient bientôt. *Autopsie immédiate.* Grande quantité de sang fluide dans la cavité péritonéale (environ 45 cent. cubes). Tous les viscères apparaissent anémiés. Les intestins sont pâles et de couleur lardacée ; leurs parois sont tuméfiées et leur contenu fortement diarrhéique se montre constitué d'énormes quantités de leucocytes, de cellules épithéliales desquamées et de rares globules rouges. Le foie, les reins et les surrénales sont exsangues. L'épiploon est également exsangue, mais parsemé de petits coagulums sanguins adhérents. La rate et l'estomac sont, toutefois, d'apparence normale. Les veines mésentériques sont, au contraire, très congestionnées. Les anses intestinales sont en grande partie entourées d'un coagulum en réseau étendu que l'on peut extraire tout entier et d'un poids de 17 grammes. La vessie renferme peu d'urine, très alcaline, mais sans trace d'albumine.

A l'ouverture de la cavité thoracique, nous observons que les poumons sont tous deux très anémiés, mais parsemés de taches lenticulaires, typiques, hémorragiques. Les cultures du sang et des divers organes sont restées négatives.

II. Lapin ♀ n° 70, de 1.930 grammes.

11 mai 1938, 11 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

12 mai 1938, 11 heures. Même injection.

13 mai 1938, 11 heures. Même injection.

Tout de suite après la dernière injection, l'animal commence à présenter des malaises. Soudainement, il est pris de convulsions, de dyspnée et meurt en trois minutes. *Autopsie immédiate.* Copieuse sérosité hématique dans le péritoine. Intestins nettement diarrhéiques, congestionnés, de couleur hortensia et, en quelques points, de couleur lie de vin. Appendice et plaque lymphatique iléo-cæcale très congestionnés. Un long coagulum sanguin qui part du lobe postérieur du foie, s'étend et se perd dans les replis des anses intestinales. Le foie, la rate et les reins, ainsi que les surrénales, semblent normaux. Le corps de

l'utérus est dilaté et rempli d'un liquide citrin qui, au microscope, apparaît très riche en cellules épithéliales et en leucocytes ; les cornes de l'utérus sont très congestionnées et, en quelques points, hémorragiques et de couleur lie de vin. De part et d'autre de la ligne lombo-sacrée, au long des grands muscles psoas, nous observons des infiltrats hémorragiques sous-séreux étendus. La vessie est contractée ; on y aspire à la pipette 1 cent. cube d'urine alcaline, non albumineuse. A l'ouverture de la cage thoracique, on observe que la surface des poumons est parsemée d'une très grande quantité de pétéchies lenticulaires. Cultures négatives du sang et des divers organes.

III. Lapin ♀, n° 53, de 1.650 grammes.

20 février 1938, 10 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

21 février 1938, 10 heures. Même injection.

22 février 1938, 10 heures Même injection.

Tout de suite après la troisième injection, l'animal se débat, devient paraplégique, présente de la dyspnée et meurt. *Autopsie immédiate.* De la cavité péritonéale, on extrait environ 10 cent. cubes de sérosité de couleur rosée. Toutes les anses intestinales apparaissent diarrhéiques, énormément injectées de sang, de couleur hortensia. Egalement, les veines mésentériques et celles des parois stomacales apparaissent très dilatées. L'appendice présente la couleur hortensia et ses parois tuméfiées sont énormément congestionnées. La portion duodénale de l'intestin est, peut-être, celle qui a réagi avec la plus forte intensité : ses parois, de couleur hortensia, semblent aplaties et amincies ; le contenu est très diarrhéique. Le foie est quelque peu congestionné. Les reins et les surrénales semblent normaux. L'utérus présente les deux cornes intensément congestionnées et hémorragiques ; leur muqueuse est couleur lie de vin. De la vessie, fortement contractée, on extrait 3 cent. cubes d'urine alcaline, non albumineuse.

A l'ouverture de la cage thoracique, les poumons apparaissent quasi exsangues, mais parsemés de pétéchies lenticulaires, du type « vanessa ». Cultures du sang et des divers organes, négatives.

IV. Lapin ♂, n° 82, de 1.600 grammes.

22 juin 1938, 11 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

23 juin 1938, 11 heures. Même injection.

A peine terminée cette seconde injection, l'animal est pris d'accès convulsifs, de dyspnée et présente un état à peu près asphyxique. La tête est renversée en arrière ; on compte environ 188 respirations par minute ; les battements du cœur sont incomptables ; la température rectale est de 40°; une grave prostration dure encore toute l'après-midi.

24 juin 1938, 11 heures. L'animal paraît complètement rétabli ; il présente seulement un torticolis typique. On pratique la troisième injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive. Pendant quelque temps, l'animal ne présente aucun symptôme anormal. Mais, environ deux heures plus tard, il est pris de convulsions et meurt subitement.

Autopsie immédiate. Cavité péritonéale avec sérosité hématique. Toutes les anses intestinales sont très diarrhéiques et congestionnées.

Les parois du gros intestin présentent de nombreuses taches hémorragiques. L'épiploon et le mésentère ont l'un et l'autre toutes leurs veines énormément dilatées. Le foie et les reins sont congestionnés, mais la rate est d'un aspect normal. Les cornes de l'utérus sont très congestionnées et, en certains points, la muqueuse apparaît parsemée de légères hémorragies. De la vessie, fortement contractée, nous extrayons 4 cent. cubes d'urine de réaction acide et riche en albumine (5 p. 1.000).

Dans la cavité thoracique on trouve un peu de sérosité hématique : les poumons apparaissent parsemés de grandes taches hémorragiques de l'aspect typique déjà décrit.

Cultures du sang et des divers organes, négatives.

Les résultats de ces expériences sont assez démonstratifs et caractéristiques pour nous dispenser d'explications (93).

V. — Réactivité cutanée et prémunition antiallergique.

De l'ensemble des données que nous venons d'exposer, il résulte donc, à l'évidence, que les réactions allergiques de nature nettement hémorragique, provoquées chez les lapins par les injections intraveineuses de salive stérilisée, sont à tous égards, assimilables au phénomène désigné par les auteurs sous notre nom.

L'antigène préparant et l'antigène déchaînant sont toujours, dans un cas comme dans l'autre, de la même nature. La seule différence entre les deux phénomènes consiste surtout en ce que, pour provoquer avec la salive l'attaque d'allergie hémorragique, les injections intraveineuses faites à vingt-quatre heures d'intervalle, doivent être au nombre de 3 au lieu de 2.

Le nombre des expériences et des diverses variantes effectuées au cours de ces recherches a été assez élevé et les résultats obtenus ont été généralement assez uniformes.

Nous nous bornerons à reproduire encore quelques observations qui, à notre avis, peuvent fournir des connaissances complémentaires.

A. Réactivité salivaire cutanée. — Après avoir observé les imposantes réactions hémorragiques viscérales, nous avons

(93) Voir G. Sanarelli. *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 1049.

voulu voir s'il était possible de provoquer les mêmes réactions sur des organes ou des tissus déterminés, à commencer par la peau.

Les expériences suivantes faites en préparant les lapins par des injections intradermiques, le premier (n° 73) avec de la salive inactivée et le second (n° 78) avec de la salive naturelle, c'est-à-dire non chauffée, peuvent offrir une idée suffisamment nette concernant cette réactivité cutanée.

V. Lapin ♀, n° 73 de 1.400 grammes.

6 mars 1938, 11 heures. Injection intradermique sur le flanc gauche épilé, de 0 c. c. 2 de salive inactivée à 60°.

7 mars 1938, 11 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée à 60°.

8 mars 1938, 11 heures. La zone cutanée, siège de l'injection, se présente avec une légère couleur rosée. On pratique une seconde injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée. Peu après le lapin est pris de convulsions et meurt.

Autopsie immédiate. La cavité péritonéale renferme une certaine quantité de lymphe non hématique. Les anses intestinales sont très congestionnées. Le long des grands muscles psoas on observe de petites suffusions hémorragiques. Foie, rate et poumons normaux. Vessie avec 3 cent. cubes d'urine non albumineuse.

Si l'on examine la face interne de la peau, on observe dans la zone correspondant à l'injection intradermique, une intense et vaste infiltration hémorragique que l'on aperçoit moins bien lorsqu'on examine la peau à l'extérieur.

Dans la supposition que la présence d'une réaction cutanée aussi intense pourrait avoir précédé la seconde injection intraveineuse, nous avons fait une autre expérience en sacrifiant le lapin vingt-quatre heures après la première injection intraveineuse.

VI. Lapin ♀, n° 74 de 1.500 grammes.

10 mars 1938, 11 heures. Injection intradermique dans le flanc gauche épilé, de 0 c. c. 2 de salive inactivée.

11 mars 1938, 11 heures. Injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

12 mars 1938, 11 heures. La zone cutanée injectée présente seulement une légère tuméfaction. On sacrifie l'animal. L'examen de la face interne de la peau révèle une intense infiltration hémorragique diffuse sur une zone étendue, correspondant au point d'inoculation. Rien à noter dans les autres organes et tissus.

VII. Lapin ♀, n° 75 de 1.500 grammes (témoin).

10 mars 1938, 11 heures. Injection intradermique sur le flanc gauche épilé, de 0 c. c. 2 de salive inactivée.

11 mars 1938, 11 heures. La zone inoculée est d'aspect normal.

12 mars 1938, 11 heures. La même zone apparaît légèrement tuméfiée et de teinte à peine rosée. On sacrifie l'animal. A l'examen de la face interne de la peau on observe seulement une légère coloration rose, mais sans trace d'hémorragies.

Nous avons cru opportun de répéter une expérience analogue en employant, non plus la salive inactivée à 60°, mais la salive naturelle. Nous pensions que la très petite quantité de liquide salivaire injectée sous le derme n'aurait pas déterminé la septicémie streptococcique, rendant moins nette la réaction allergique provoquée. Et, de fait, dans ces cas, la septicémie ne s'est jamais produite.

VIII. Lapin ♀, n° 78 de 1.300 grammes.

15 mars 1938, 10 heures. Injection intradermique, sur le flanc gauche épilé, de 0 c. c. 2 de salive fraîche.

16 mars 1938, 10 heures. Dans la zone inoculée, la peau est rougie ; on observe dans la partie centrale un point jaunâtre qui semble indiquer un début de nécrose.

18 mars 1938, 10 heures. La zone cutanée inoculée est tuméfiée et quelque peu rougie ; la partie centrale semble prête à suppurer. Mais la zone périphérique est moins rouge. On pratique une injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée à 60°.

L'animal meurt le soir, c'est-à-dire trois jours et demi après la première injection intradermique et quelques heures après l'injection intraveineuse.

A l'autopsie, on note un peu de sérosité dans le péritoine. Examinée sur sa face interne, la peau présente une réaction hémorragique manifeste, quoique un peu moins intense que chez le lapin n° 73. Les anses intestinales, le foie, la rate, les reins et les surrénales sont d'aspect normal. La vessie renferme 10 cent. cubes d'urine très albumineuse. Les poumons sont un peu congestionnés, avec diverses petites pétéchies lenticulaires.

Cultures négatives du sang et des organes.

Nous devons donc conclure que la salive naturelle, c'est-à-dire non chauffée à 60°, peut servir d'antigène préparant, provoquant des réactions cutanées hémorragiques semblables à celles qu'on obtient au moyen des cultures mortes et des filtrats bactériens. Il semble qu'il n'y ait pas de différence notable si l'on emploie, pour les injections intradermiques préparantes, la salive inactivée ou la salive fraîche naturelle, c'est-à-dire non chauffée. Mais dans ce dernier cas, il faut

signaler la présence de la néphrite révélée par une grande quantité d'albumine dans l'urine. Et, puisque dans les autres expériences d'allergie salivaire effectuées en employant de la salive inactivée à 60° on ne constate pas de néphrite, on doit retenir que, dans le cas du lapin n° 78, il s'est exercé au détriment des reins, bien que l'examen bactériologique ait été négatif, une action préparante locale, c'est-à-dire rénale, due aux microbes vivants (streptocoques) inoculés dans le derme. Des expériences décrites au chapitre III, il résulte, en effet, que la néphrite se constate toujours chez les lapins qui meurent de septicémie streptococcique déclenchée par des injections intraveineuses de salive non chauffée.

A titre de complément aux présentes recherches nous ajouterons ces autres observations.

B. Prémunition salivaire antiallergique. — Nous avons déjà dit au commencement du chapitre IV de ce mémoire que les lapins pouvaient tolérer durant de nombreux jours de suite les injections intraveineuses de salive inactivée, à condition que celles-ci soient pratiquées à dose relativement discrète (5 cent. cubes) et à certains intervalles.

Effectivement, après avoir reçu 4 ou 5 injections intraveineuses de salive inactivée, les lapins manifestent quelque diminution de poids Mais il suffit de suspendre les injections pendant cinq ou six jours, pour que les animaux reviennent à leur poids initial. Alors, on peut aussi bien recommencer les injections intraveineuses que les péritonéales. Ces dernières peuvent être encore de 10 cent. cubes chacune et sont encore mieux tolérées. Après une telle préparation, les lapins résistent aussi au déchaînement de l'allergie salivaire.

Voici un exemple typique :

IX. Lapin n° 35 de 1.600 grammes.

A dater du 22 juin, nous pratiquons, à deux reprises, une dizaine d'injections intraveineuses de salive inactivée, de 5 cent. cubes chacune, et successivement, à divers intervalles, dix autres injections péritonéales de 10 cent. cubes chacune. Le 18 mars, c'est-à-dire au bout de cinquante-cinq jours, après avoir présenté diverses oscillations dans le poids du corps, et vingt-deux jours après la dernière injection péritonéale, le lapin avait définitivement récupéré son poids initial.

Alors, un lapin de même poids ayant été choisi comme témoin (lapin n° 35 *bis*), nous pratiquons sur l'un et l'autre, à une distance de vingt-quatre heures l'une de l'autre, les trois injections intraveineuses de 10 cent. cubes de salive inactivée dans le but de déchaîner l'attaque allergique mortelle.

Le lapin témoin n° 35 *bis* meurt aussitôt après la troisième injection, présentant à l'autopsie le tableau anatomo-pathologique déjà décrit.

Le lapin prémuni n° 35 ne présente, au contraire, aucun trouble. Il y a bien eu, durant quatre jours, une légère diminution de poids, mais au bout d'une semaine, il avait atteint le poids de 1.850 grammes.

Cependant, si les injections, même à doses faibles, sont pratiquées à intervalles trop rapprochés, les animaux finissent par mourir, ainsi que le démontre l'expérience suivante :

X. Lapin n° 10, de 2.000 grammes.

Du 29 janvier au 6 février, nous faisons huit injections intraveineuses de 5 cent. cubes chacune et, du 7 au 14 février, sept autres injections péritonéales de 10 cent. cubes chacune. Le 16 février, l'animal meurt. Son poids était tombé à 1.300 grammes. A l'autopsie, exception faite de l'habituelle constatation de petits lambeaux fibrino-purulents adhérents aux anses intestinales, on ne trouve de remarquable qu'une appendicite hémorragique. L'appendice apparaît, en effet, parsemé de petites pétéchies et, sur son tiers inférieur, il est de couleur noirâtre à cause des infiltrations hémorragiques qui intéressent toute l'épaisseur de sa grosse paroi.

Il y a aussi des cas dans lesquels la prémunition ou préparation antiallergique s'est produite chez les lapins avec un petit nombre d'injections péritonéales et intraveineuses, comme le démontre l'expérience suivante :

XI. Lapin n° 18 de 1.750 grammes.

Aux dates des 20 et 24 février, nous pratiquons deux injections péritonéales de 10 cent. cubes chacune. Les 26 et 28 février suivants, nous faisons encore deux injections intraveineuses de 10 cent. cubes chacune.

L'animal présente durant quelque temps une certaine diminution de poids, mais quelques jours après, exactement le 10 mars suivant, il avait déjà récupéré son poids originel de 1.750 grammes. Alors, entre le 11 et le 13 mars, à des intervalles de vingt-quatre heures, nous pratiquons les trois injections de 10 cent. cubes de salive inactivée. Le lapin présente une nouvelle et transitoire diminution de poids. Le 1er avril, c'est-à-dire dix-neuf jours plus tard, le poids de l'animal bien portant était déjà augmenté à 1.950 grammes. On décide de renouveler pour la seconde fois, dans les journées des 2, 3 et 4 avril, les trois injections intraveineuses préparantes et déchaînantes de salive, de 10 cent. cubes

chacune, en soumettant au même traitement un lapin témoin n° 16 *bis* de poids égal.

Aussitôt après la troisième injection ce lapin témoin meurt comme de règle, en présentant les symptômes bien connus et les lésions habituelles. Le lapin n° 18, prémuni et préparé, a présenté une seconde oscillation pondérale, transitoire, mais il a survécu.

Nous avons, par contre, observé que les injections sous-cutanées de salive ne protégeaient pas les lapins. Nous avons également constaté que ces injections, à l'encontre des injections intraveineuses, ou péritonéales, avaient tendance à provoquer des néphrites.

Même, si l'on procède avec précaution et aussi si l'on commence les trois injections allergisantes, puis déchaînantes, alors que le poids du corps des lapins traités est déjà redevenu égal au poids initial, les animaux succombent toujours.

Quelquefois, la mort survient dès la première injection et, à l'autopsie, on trouve toujours l'urine très albumineuse. Si les lapins succombent après la troisième injection, ils présentent le tableau anatomo-pathologique typique, déjà décrit, de l'allergie salivaire, compliquée cependant d'une très grave néphrite hémorragique.

Voici une expérience démonstrative :

XII. Lapin n° 38 de 1.650 grammes.

A partir du 26 février, il a reçu, dans l'espace de vingt et un jours, quatre injections sous-cutanées de salive inactivée : deux de 5 cent. cubes et deux de 10 cent. cubes, sans montrer aucune diminution de poids. De fait, alors que le 19 mars il était soumis à la triple injection intraveineuse, son poids était de 1.700 grammes, c'est-à-dire légèrement supérieur à celui du début.

Le lapin meurt subitement après la troisième injection, présentant outre les habituelles lésions caractéristiques, une néphrite hémorragique tellement intense, que la petite quantité d'urine extraite de la vessie très contractée, était sanguinolente et coagulait en bloc lorsqu'on la chauffait à la flamme.

Cela fait supposer que les précédentes injections salivaires sous-cutanées avaient été sans effet contre une crise allergique salivaire provoquée par voie intraveineuse. Il semble, bien au contraire, que dans de tels cas, l'organisme est rendu, non seulement plus sensible, mais que les injections sous-cutanées

pratiquées précédemment peuvent préparer et sensibiliser aussi les reins, de manière que le déclenchement du choc allergique produit en même temps une très grave néphrite hémorragique.

Enfin, aucune prémunition ou préparation antiallergique ne peut dériver des injections intraveineuses, même longtemps répétées, de salive décantée.

Nous avons rapporté plus haut, au chapitre III, le cas du lapin n° 11, de 1.700 grammes, qui, dans l'espace de treize jours, avait bien toléré dans les veines l'introduction d'un total de 130 cent. cubes de salive stérilisée et décantée. A la date du 7 mars, le poids de l'animal, apparemment bien portant, était monté à 1.850 grammes. Le même jour, on commence la série habituelle des trois injections intraveineuses de 10 cent. cubes de salive. Malgré la longue préparation précédente avec la salive décantée, l'animal meurt peu après la troisième injection, présentant à l'autopsie le tableau typique de l'allergie salivaire hémorragique.

Des expériences que nous venons de rapporter, nous pouvons donc tirer les conclusions suivantes :

Le phénomène de l'allergie salivaire hémorragique peut être provoqué, chez les lapins, même dans la peau, toutes les fois que celle-ci a été opportunément préparée au moyen d'une injection intradermique de salive.

Une préparation adéquate au moyen d'injections intraveineuses de salive inactivée, faites à des doses bien tolérées, prémunit les lapins contre le déclenchement de l'allergie salivaire hémorragique. Il est cependant nécessaire que les injections, même si elles ne sont pas nombreuses, soient pratiquées avec précaution, c'est-à-dire à des intervalles convenables. Les animaux ne résistent pas aux injections trop rapprochées et, dans ce cas, on peut trouver à l'autopsie une appendicite hémorragique typique, semblable à celles que nous avons reproduites expérimentalement par voie circulatoire et que nous avons décrites dans de précédents travaux (94).

(94) G. SANARELLI. Ces *Annales*, **38**, 1924, p 46 — Les entéropathies microbiennes, Paris 1924, p. 153. *Rassegna clinico-scientifica*, **16**, 1938, p. 211.

Il n'est pas possible d'obtenir une prémunition ou une préparation quelconque contre l'attaque allergique salivaire en traitant, même pendant longtemps, les lapins avec des injections péritonéales de salive. A l'autopsie des lapins qui succombent par allergie salivaire hémorragique après avoir reçu et bien toléré auparavant plusieurs injections sous-cutanées de salive inactivée, on trouve parfois une grave néphrite hémorragique, ce qui signifie que, dans ces cas, les injections sous-cutanées antérieurement pratiquées ont sensibilisé et préparé aussi le parenchyme rénal.

De même, aucune prémunition antiallergique ne peut être obtenue par les injections, même répétées durant longtemps et à doses élevées, de salive inactivée et décantée, c'est-à-dire dépouillée de ses éléments morphologiques.

VI. — L'allergie salivaire hémorragique n'a pas un caractère de spécificité

Nous avions l'impression, au cours de ces recherches, que la prémunition contre le phénomène allergique salivaire ne devait pas posséder le caractère d'une réelle spécificité.

Même en admettant que la partie active de la salive injectée relevât du contenu de la flore microbienne, nous nous sommes demandé si l'on pourrait réaliser une certaine prémunition contre l'attaque au moyen d'une opportune préparation faite avec des bactéries différentes des bactéries salivaires.

Nous avions, par hasard, dans notre laboratoire, quelques lapins ayant survécu à d'anciennes et légères infections provoquées, au début de décembre 1937, par voie sous-cutanée, avec des cultures pures mais peu actives, de bacilles dysentériques (Shiga). Au cours de l'infection dysentérique chronique ainsi provoquée, ces lapins avaient été soumis également, pendant une durée d'environ trois mois, à diverses injections sous-cutanées d'une anaentérotoxine préparée de la manière décrite dans notre article précédemment mentionné (95).

Après diverses oscillations, aux premiers jours du mois de

(95) *Presse Médic.*, 1937, p. 18[illegible].

mars 1938, le poids de ces 4 lapins (nos 29, 40, 45 et 46) était revenu pour chacun d'eux à sa valeur primitive, c'est-à-dire aux environs de 1.600 à 1.700 grammes.

On pouvait donc en déduire que l'infection dysentérique avait complètement disparu.

Le 5 mars, nous essayons la résistance de ces lapins à l'allergie salivaire, en les soumettant à l'habituelle triple injection intraveineuse de 10 cent. cubes de salive inactivée.

Le premier lapin, n° 29, de 1.700 grammes meurt en proie à des convulsions, peu après la troisième injection. A l'autopsie on trouve une intense congestion veineuse de tous les organes abdominaux, intéressant d'une manière particulière l'épiploon qui était, d'autre part, parsemé de cysticerques. Dans les poumons s'observaient pareillement de petites pétéchies lenticulaires caractéristiques.

Les trois autres lapins, du poids respectif de 1.600, 1.650 et 1.700 grammes, survécurent en présentant seulement, par la suite, de légères oscillations pondérales.

Bien plus, chez le lapin n° 40, de 1.600 grammes, qui avait supporté la triple injection intraveineuse sans manifester le moindre malaise, mais en présentant seulement une légère diminution de poids, les injections intraveineuses de 10 cent. cubes furent répétées durant six autres jours. En tout, du 5 au 14 mars, c'est-à-dire pendant dix jours seulement, ce lapin avait supporté 9 injections intraveineuses de 10 cent. cubes chacune. Son poids était tombé jusqu'à 1.410 grammes. Mais, par la suite, l'animal s'était complètement rétabli et son poids avait remonté à 1.870 grammes.

Nous décidâmes alors de répéter pour la seconde fois la triple injection salivaire intraveineuse de 10 cent. cubes. L'animal accusa encore une fois une légère diminution de poids, mais se rétablit bientôt et survécut. Peu de temps après il avait atteint le poids de 1.900 grammes !

Ces faits nous conduisent à retenir qu'une toxi-infection causée par un microbe aussi typiquement entérotrope et toxigène que le bacille de Shiga, peut prémunir assez bien contre l'attaque d'allergie salivaire hémorragique. L'insuccès constaté chez le lapin n° 29 peut être attribué au fait que l'animal

était très infesté de cysticerques. Nous avons eu plusieurs fois l'occasion de remarquer que la présence de ces parasites dans la cavité abdominale des lapins, place toujours ces animaux en état de faible résistance contre les infections.

Ayant, à notre avis, suffisamment déterminé les conditions essentielles concernant ce curieux phénomène, nous nous sommes posé une dernière question.

Du moment que le liquide salivaire, privé par décantation, de ses détritus cellulaires et de sa flore bactérienne multiforme, reste totalement inoffensif et inopérant, à quels éléments de la salive devrons-nous imputer les actions préparante et déchaînante du phénomène allergique ?

Sont-elles imputables aux produits cellulaires ou aux bactéries de la salive ?

L'impossibilité absolue où l'on est de séparer dans la salive ces éléments intimement liés les uns aux autres nous a obligé à recourir à l'expédient d'injecter dans les veines des animaux les seuls produits cellulaires ou les seules bactéries.

Pour obtenir une émulsion d'éléments cellulaires comparable, au point de vue de sa teneur en matière organique, à la salive intégrale, mixte, normale, employée dans nos expériences, nous avons eu recours au contenu purulent d'un abcès froid recueilli à la Clinique chirurgicale de l'Université. Les cultures de ce pus n'avaient donné lieu à aucun développement bactérien et l'examen bactérioscopique avait été négatif. De même, les cultures sur milieu à l'œuf étaient restées stériles.

Ce pus, qui était très dense et apparemment amicrobien, fut dilué dans une solution physiologique en proportions convenables pour former une émulsion qui, à l'analyse chimique, se présentait comme possédant une teneur en matière organique à peu près égale à celle de notre salive, c'est-à-dire 3,80 p. 100.

Ainsi préparés, les divers tubes renfermant l'émulsion de pus furent mis pendant une demi-heure, ainsi que nous l'avions toujours fait pour la salive, au bain-marie à 60°.

Les lapins inoculés à plusieurs reprises dans les veines avec 10 cent. cubes de cette émulsion, n'ont jamais présenté de réaction allergique.

Les trois injections intraveineuses faites à vingt-quatre heures d'intervalle l'une de l'autre furent toujours bien supportées par les animaux.

Vu ce résultat négatif, on continue encore, durant cinq et

six autres jours, chez deux de ces lapins (nos 68 et 69), du poids respectif de 1.500 et 1.950 grammes, les injections intraveineuses. Le lapin 68 succomba après la huitième injection et le lapin 69 après la neuvième, l'un et l'autre en proie à un fort amaigrissement. Le poids du premier était descendu à 1.200 grammes et celui du second à 1.600. Les constatations anatomiques restèrent, cependant, insignifiantes. Aucune lésion particulière. Les animaux étaient évidemment morts de marasme dû à l'action nocive de l'émulsion purulente stérilisée.

Un gros lapin (n° 70) de 2.100 grammes avait bien résisté à six injections intraveineuses consécutives de 10 cent. cubes de la même émulsion de pus. Cinq jours après la dernière injection, son poids était diminué de 170 grammes seulement. Soumis à la triple injection salivaire, dans le but de voir si les précédentes injections l'avaient rendu plus résistant à l'attaque allergique, subitement après la troisième injection intraveineuse, le lapin présente des malaises et meurt en quarante-cinq minutes environ, sans attaque convulsive. L'autopsie montre l'un des tableaux les plus typiques et les plus graves de l'allergie salivaire hémorragique : sérosité hématique dans le péritoine, hémorragies diffuses le long des muscles psoas ; anses intestinales énormément congestionnées, diarrhéiques et de couleur hortensia ; vessie contractée et vide ; poumons parsemés de nombreuses pétéchies extrêmement caractéristiques, etc. Cultures négatives.

En conclusion : les injections intraveineuses d'une émulsion de pus, antigène leucocytaire comparable à la salive du point de vue de sa teneur en matière organique, ne provoquent pas, chez les lapins, le phénomène de l'allergie hémorragique. De telles injections ne restent cependant pas indifférentes. Elles exercent une action toxique qui est progressive et cachectisante et, à la longue, elles font périr les animaux. Mais, les animaux qui ont bien supporté de multiples injections intraveineuses de l'antigène leucocytaire, ne manifestent aucune prémunition ou résistance envers l'attaque allergique salivaire.

Il est, par conséquent, difficile d'admettre, sans plus, que l'allergie provoquée par les injections de salive puisse être de

nature protéique, c'est-à-dire imputable aux seuls éléments cellulaires et à leurs débris contenus dans la salive humaine normale.

Résultats négatifs aussi en injectant dans la veine du lapin des émulsions bactériennes.

Celles-ci furent préparées en émulsionnant dans du sérum physiologique une certaine quantité du contenu diarrhéïque provenant du cæcum d'un lapin mort à la suite d'une crise allergique. On sait que cette matière fécale est constituée presque totalement par des bactéries qui, à de nombreux égards, rappellent celles de la flore salivaire.

Après un séjour de quarante-huit heures dans la glacière, l'émulsion fécale fut filtrée, une première fois sur papier-filtre ordinaire et une seconde fois sur filtre finement poreux. Le liquide filtré, un peu trouble, avait une couleur brunâtre et une réaction légèrement alcaline. L'analyse révélait 5,6 p. 100 de matière organique. Pour ramener cette teneur à celle (3,80 p. 100) de notre salive, nous avons simplement ajouté à l'émulsion fécale mère un tiers de sérum physiologique. Après quoi, l'émulsion fécale fut stérilisée pendant trois jours consécutifs à 60°.

Les injections intraveineuses quotidiennes de 10 cent. cubes n'ont jamais déterminé de crise allergique. Ces injections, tout comme celles de pus, manifestent une action indubitablement nuisible au cours de laquelle les animaux maigrissent subitement, à partir de la première injection. Si, ensuite, les injections sont répétées quotidiennement de 6 à 8 fois, les lapins de poids moyen finissent par mourir. Mais, à l'autopsie, on ne découvre aucune lésion qui puisse être rapportée à une crise allergique. Dans ces cas également, les animaux meurent amaigris et diarrhéiques.

Le résultat de ces expériences rend assez difficile, au moins pour le moment, d'exprimer une opinion sur la nature réelle de l'allergie hémorragique obtenue au moyen des injections intraveineuses de salive et sur les rôles respectivement attribuables, dans la production de ce phénomène, aux divers éléments constitutifs du liquide salivaire.

Il faut se borner à de simples hypothèses.

Le seul fait positif ressortant des expériences décrites dans ce dernier chapitre concerne la résistance présentée à l'attaque

d'allergie salivaire hémorragique, par les animaux ayant subi antérieurement une infection non grave, provoquée par des cultures atténuées de germes toxigènes et entérotropes, tels que les bacilles dysentériques.

Résumé et conclusions.

Résumant les résultats de nos recherches, nous croyons pouvoir conclure :

1° Le phénomène de l'allergie hémorragique qui a été signalé et décrit par nous pour la première fois et que, pour cette raison, les auteurs ont proposé de reconnaître comme « phénomène de Sanarelli », a pu être reproduit et étudié expérimentalement, toujours en s'inspirant de nos indications et directives, par un grand nombre de chercheurs. Le phénomène a pu être observé dans presque tous les organes et tissus de l'organisme, par l'emploi d'antigènes préparants ou déchaînants les plus divers. Nos expériences actuelles ont démontré que l'allergie hémorragique peut être réalisée chez les lapins, même en employant comme antigène la salive mixte intégrale humaine recueillie directement de la cavité orale.

2° Mais, pour reproduire l'allergie salivaire hémorragique, il ne suffit pas de faire deux injections : l'une préparante et l'autre déchaînante, à vingt-quatre heures d'intervalle, comme pour obtenir chez les lapins le « phénomène de Sanarelli ». En employant la salive, nous avons besoin, au contraire, de 3 injections, toujours pratiquées dans la veine, à vingt-quatre heures l'une de l'autre.

3° Peu de temps après la troisième injection intraveineuse, les animaux sont subitement pris d'accès dyspnéiques et convulsifs, suivis rapidement de mort. A l'autopsie, on trouve habituellement des altérations anatomiques graves et caractéristiques : sang dans le péritoine, congestion intense de tous les organes et de toutes les muqueuses, fréquentes hémorragies dans certains viscères : parois intestinales, muscles psoas, cornes utérines, reins, mais plus spécialement dans les poumons. Ici les hémorragies apparaissent à l'extérieur sous forme de pétéchies lenticulaires, souvent assez nombreuses. Ces

hémorragies lenticulaires ressemblent à celles du type « vanessa », qui s'observent dans les poumons des cobayes ayant succombé à l'infection spirochétienne. L'examen microscopique des sections du poumon pratiquées au niveau de ces pétéchies superficielles confirme que celles-ci sont dues à la rupture brusque des capillaires alvéolaires, qui donne lieu à une inondation sanguine dans certaines zones du parenchyme pulmonaire.

4° Pour déclencher chez les lapins l'attaque d'allergie salivaire hémorragique, il faut pratiquer les injections avec de la salive mixte stérilisée pendant une heure, au bain-marie à 60°. Les injections de salive naturelle, c'est-à-dire non stérilisée, sont à exclure, parce que, faites aux doses nécessaires pour déterminer la crise allergique, elles produisent sûrement, chez les lapins, la septicémie streptococcique.

5° Les injections sous-cutanées ou péritonéales de salive stérilisée à la température indiquée sont généralement bien tolérées par les animaux. Elles peuvent, dans la plupart des cas, être répétées plusieurs fois de suite, mais sont incapables de déclencher la crise allergique. Elles déterminent seulement une diminution progressive du poids et, à la longue, peuvent aussi faire mourir les animaux de cachexie.

6° Les doses de salive qui ont été reconnues nécessaires pour chacune des injections intraveineuses afin d'obtenir, après la troisième injection, l'apparition de la crise allergique mortelle, sont de 10 cent. cubes. Des doses moindres de salive, même injectées durant quelques jours de suite, sont, au contraire, bien tolérées. Dans ces cas, l'organisme animal a, sans doute, le temps et la manière de se libérer, par ses émonctoires naturels, de toutes les bactéries salivaires et des copieux détritus protéiques qui sont déversés chaque fois dans la circulation sanguine.

7° Si les doses de salive inactivée introduites dans les veines sont un peu plus élevées ou pratiquées à une plus grande fréquence, les lapins souffrent de gastro-entérite chronique, due, selon toutes probabilités, à l'action toxique exercée sur les parois gastro-intestinales, surtout par les protéides de la flore bactérienne salivaire. Dans ces cas, les animaux s'alimentent

toujours moins, maigrissent progressivement et finissent par mourir de cachexie.

Par contre, les injections intraveineuses de salive inactivée mais décantée, c'est-à-dire dépouillée par décantation spontanée de ses principaux composants microbiens et cellulaires, sont très bien supportées, même si elles sont pratiquées à doses élevées et pendant plusieurs jours de suite. Cela signifie que les effets allergisants du liquide salivaire sont uniquement dus à ses composants figurés.

8° Outre les réactions allergiques viscérales obtenues au moyen d'injections intraveineuses de salive, on peut provoquer, chez les lapins, de la réactivité hémorragique même dans le tissu cutané, chaque fois que ce dernier a été opportunément préparé au moyen d'injections intradermiques de salive, même à doses minimes.

9° La réactivité salivaire cutanée peut être provoquée en employant également la salive naturelle, c'est-à-dire non stérilisée à 60°. Dans ce cas, les petites doses (0 c. c. 2) de liquide salivaire injecté dans le derme, ne sont pas suffisantes pour déterminer une septicémie streptococcique. La dernière injection intraveineuse déchaînante, de salive inactivée, exécutée au troisième jour, chez les lapins préparés par voie intradermique, tue comme d'habitude les animaux par choc allergique. A l'autopsie, outre la réaction hémorragique locale, on constate le tableau typique de l'allergie viscérale, aggravé par la néphrite, comme cela s'observe toujours dans les septicémies streptococciques.

10° Les lapins antérieurement soumis à des injections intraveineuses faibles et supportables de salive inactivée, deviennent résistants à l'égard de l'allergie salivaire hémorragique provoquée par la triple injection intraveineuse. Les mêmes lapins semblent si bien prémunis, qu'ils sont en mesure de supporter impunément, après la première épreuve, une nouvelle triple série d'injections intraveineuses à doses allergisantes. La possibilité existe donc de déterminer une facile prémunition ou préparation salivaire antiallergique.

11° Inversement, il n'est pas possible d'obtenir de préparation salivaire antiallergique au moyen d'injections sous-cuta-

nées ou péritonéales de salive. Il semble aussi que les injections sous-cutanées, quoique bien supportées en apparence, diminuent la résistance des lapins vis-à-vis des crises allergiques provoquées par la suite et rendent également possible l'apparition d'une néphrite hémorragique, qu'on n'observe jamais lorsque la crise allergique se déclenche chez des lapins neufs. De même les injections intraveineuses de salive décantée, c'est-à-dire privée de presque tous ses éléments figurés (cellules et bactéries), ne sont pas capables de réaliser une préparation ou prémunition allergique quelconque.

12° L'allergie salivaire hémorragique ne semble pas avoir un caractère de stricte spécificité. En fait, les lapins qui ont pu surmonter une faible infection spécifique, déterminée par des microbes aussi nettement entérotropes et toxigènes que les bacilles dysentériques, apparaissent bien prémunis contre l'attaque allergique provoquée par la triple injection salivaire intraveineuse.

13° Des injections intraveineuses pratiquées avec des émulsions de leucocytes (corpuscules pyoïdes) ou avec des émulsions bactériennes (bactéries fécales) dans le but de connaître quels sont les agents préparants ou déchaînants des crises allergiques salivaires et de déterminer si ces dernières sont dues aux granulocytes salivaires ou aux microbes de la salive, n'ont pas permis de résoudre la question. Les injections pratiquées avec ces matériaux semblent incapables de provoquer des crises allergiques du type hémorragique. Elles ne sont cependant pas indifférentes pour les animaux puisqu'elles produisent une cachexie mortelle lorsqu'on les répète plusieurs fois.

RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE DU BACILLE TUBERCULEUX DANS LE LAIT ET LES PRODUITS DÉRIVÉS

par A. DE GROLIER et TH. VOICULESCO.

(*Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.*)

Les recherches concernant l'isolement du bacille tuberculeux du lait et de ses sous-produits se sont multipliées dans ces dernières années.

C'est en Angleterre, où l'on fait une grande consommation de lait cru, que ces recherches ont été les plus nombreuses et les plus systématiques. On y a examiné toutes sortes de laits : laits pris à la ferme, individuellement pour chaque vache ou en mélange, laits de commerce des villes, laits de mélange prélevés aux stations de chemin de fer, laits en bidons, laits considérés comme pasteurisés (pasteurisation haute, etc.). La thèse de M. Gervois : *Le bacille de type bovin dans la tuberculose humaine*, nous indique que 75.134 examens de laits ont été faits jusqu'en 1937, en Grande-Bretagne et en Irlande, avec 5.248 résultats positifs, soit 6,9 p. 100.

Parmi les travaux les plus importants, il faut citer ceux de Delépine (1898-1917), de J. W. Edington et de D. Guest (1926), de W. G. Savage (1931), de S. H. Gaiger et de G. O. Davies (1931 et 1932), de D S. Rabagliati (1931), de H. L. Torrance (1932 à 1934), de S. H. Gloyne (1932), de E. H. Pullinger (1934), de T. Ruddock-West et F. T. Alpe (1936).

Aux Etats-Unis, les recherches ont été moins nombreuses. On y a examiné 1.476 échantillons de laits (1893 et 1937) avec 126 résultats positifs, donc 8,5 p. 100.

Au Canada, R. M. Price (1934), sur 400 échantillons de lait cru en bidons (200 échantillons) et de laits de mélange avant

pasteurisation (100), — les mêmes échantillons étant examinés aussi après pasteurisation —, trouve 34 échantillons positifs (8 pour les laits en bidon, le reste pour les laits non pasteurisés), donc 8,5 p. 100.

En *Allemagne*, le total des examens de laits effectués jusqu'en 1932, s'élevait à 3 395, avec 289 cas positifs (8,51 p. 100).

Pour le reste de l'Europe, les pays où les analyses bactériologiques de lait ont été les plus nombreuses sont : l'*Italie*, 544 examens avec 67 cas positifs (6,80 p. 100) ; la *Suisse*, 245 examens avec 20 cas positifs (8,1 p. 100) ; la *Pologne*, 297 examens avec 67 cas positifs (22,5 p. 100) ; la *Grèce*. B. Ananiadès et M. Papanarghyrou (1936), sur 35 échantillons de lait pris dans le commerce, à Salonique, n'en trouvent aucun contenant des bacilles tuberculeux. H. D Boer, en *Hollande* (1934), examinant 200 échantillons de lait, a trouvé quatre fois des bacilles tuberculeux (deux fois le bacille bovin, deux fois le bacille humain). Enfin, au *Chili*, Paul Palacios et Juan de D. Rojas (1933) ne décèlent pas de bacilles tuberculeux sur 85 échantillons pris dans la ville de Santiago, mais 25 p. 100 d'autres bacilles acido-résistants.

En *France*, les recherches sont loin d'atteindre l'importance de celles faites en Angleterre ou en Allemagne, cependant l'infectiosité tuberculeuse du lait a été prouvée par les travaux de R. Legrand, Ch. Gernez, P. Crampon et E. Lefort (1938) : 75 examens avec 4 positifs (5,32 p. 100), de M. Warnery (1933) : 30 échantillons de laits examinés (24 de laits crus et 6 de laits pasteurisés) avec 2 résultats positifs (6,66 p. 100), W. Sarnowiec (1936) : 14 échantillons de laits avec 1 cas positif pour 1 échantillon de lait frais et 3 autres pour des échantillons de laits vieux, mais dans 1 seul de ces échantillons il s'agissait d'un bacille bovin.

La présence du bacille tuberculeux n'a pas été constatée seulement dans le lait, mais aussi dans tous les produits dérivés : beurre, crème, fromage. Les recherches de A. Lumière et de M^{lle} A. Dubois (1931) ont prouvé que, dans un lait qu'on a additionné de bacilles tuberculeux, ceux-ci ne s'amassent pas dans le beurre ni dans le petit-lait, mais dans le caséum. Ces recherches ont été confirmées en partie par

M. Warnery et par Ch. Gernez, F. Crampon et E. Lefort. M. Warnery, en soumettant à une centrifugation rapide et prolongée (3.500 tours pendant trente minutes) des échantillons de lait a obtenu 4 couches inégalement riches en bacilles :

Première couche.	Beurre sans bacilles.
Deuxième couche fine	Crème avec quelques bacilles.
Troisième couche	Petit-lait sans bacilles.
Quatrième couche.	Dépôt (caséum) nombreux bacilles.

On peut donc se rendre compte tout de suite de l'intérêt que peut avoir l'examen des fromages frais principalement et celui des crèmes.

La fréquence des bacilles tuberculeux dans les fromages ne paraît cependant pas être aussi grande, si l'on se réfère aux travaux de K. Goyal et M[lle] G. Obermann (1936) : 15 échantillons examinés, tous négatifs ; de W. Sarnowiec (1936 : 10 échantillons, 1 positif (fromage exposé depuis longtemps); de E J. Pullinger (1935) : 63 échantillons, tous négatifs ; de G. Sonnenheim et H. Meyer (1930) : 111 échantillons, tous négatifs. Seuls les résultats de J. Smith (1934) : 6 échantillons dont 2 positifs, et ceux de F. G. Harrisson (1902) : 5 échantillons dont 3 positifs, font exception

Les crèmes sont au contraire très infectées. Sur 31 échantillons de crème crue, K. J. Pullinger (1935) trouve 16 cas positifs, soit 51,6 p. 100. Les mêmes crèmes, après pasteurisation, étaient stériles.

De nombreux travaux ont démontré, par ailleurs, la présence du bacille tuberculeux dans le beurre. On peut citer à ce sujet, pour l'Allemagne, les travaux de L. Rabinowitsch (1897) ; de Obermüller (1897), 14 échantillons examinés, tous positifs (?) ; de Petri (1898) : 102 examens, 33 positifs ; de Ascher (1899) : 27 examens, 2 positifs ; de Heer et Beninde (1901) : 52 examens, 8 positifs.

En Grande-Bretagne, A. Eastwood (1912) trouve sur 112 échantillons examinés, 5 positifs ; J. W. Edington (1934), sur 40 examens : 1 positif ; E. J. Pullinger (1935), sur 40 échantillons examinés ne signale dans aucun la présence du bacille tuberculeux, bien que 10 échantillons aient été préparés avec de la crème non pasteurisée.

Des recherches analogues ont été faites en Suisse, Italie, Hongrie, aux Etats-Unis, aux Pays-Bas, en Grèce, etc...

En France, sont à mentionner à ce sujet les travaux de F. K. Goyal et M[lle] G. O. Obermann (1936) : 16 échantillons examinés avec un résultat positif et un douteux et ceux de W. Sarnowiec (1936) : 11 échantillons examinés avec 1 cas positif quand les échantillons de beurre étaient pris en surface au lieu d'origine et tout frais, et 3 cas positifs lorsque les mêmes beurres étaient restés exposés à la vente pendant trois jours. Les échantillons pris en profondeur ont été négatifs.

Recherches personnelles.

Pour nos recherches, nous avons employé des produits du commerce, prélevés dans différents arrondissements de Paris, de préférence chez des petits détaillants, dans des quartiers très populeux où la vente est très active et comporte souvent des produits de qualité inférieure, surtout pour le beurre.

Le lait provenait de 12 arrondissements : 5 échantillons ont été prélevés chez des commerçants des environs de Paris, un seul dans une ferme.

Le beurre et les fromages provenaient de diverses crèmeries et épiceries de 8 arrondissements de Paris.

Les échantillons de *crème* ont été prélevés dans 8 arrondissements, un seul dans la grande banlieue, à 40 kilomètres de Paris (département de Seine-et-Oise).

Les échantillons de yoghourt étaient de marques différentes.

Tous ces produits furent employés frais.

Ils se répartissent comme il suit :

Echantillons de lait cru	45
Echantillons de beurre	22
Echantillons de crème fraiche	22
Echantillons de fromage : 6 petits suisses et demi-sels, 7 fromages blancs frais	13
Echantillons de yoghourt	8

Pour la recherche du bacille tuberculeux, nous avons eu recours principalement à l'inoculation au cobaye, à raison de 3 ou 4 animaux par échantillon ; surtout pour les échantillons de crème très contaminés par une flore microbienne

variée. Les animaux restaient en observation pendant trois ou quatre mois. Au bout de ce temps, ils étaient éprouvés à la tuberculine, puis sacrifiés. Lorsqu'ils ne présentaient qu'une légère hypertrophie des ganglions correspondants au lieu de l'inoculation, on ensemençait leurs organes sur le milieu de Löwenstein, après traitement par l'acide sulfurique. Parfois, une partie du broyage était inoculée à un autre cobaye que l'on sacrifiait après deux ou trois mois

Le nombre total des échantillons éprouvés par l'inoculation au cobaye a été de 58 : 25 échantillons de lait, 8 de beurre, 14 de crème, 3 de fromage, 8 de yoghourt.

Comme ces sortes de recherches sont très longues et nécessitent un grand nombre d'animaux, nous avons essayé aussi de déceler les bacilles tuberculeux par la culture.

Tous ceux qui, dans ces dernières années, ont essayé cette méthode d'isolement se sont heurtés à de grandes difficultés, car la flore bactérienne sporulée est très abondante dans le lait. De ce fait, les résultats obtenus sont médiocres, comme en témoignent les nombreuses recherches de Gloyne, Warnery, Gernez, etc. et les nôtres

Nous avons fait de très nombreux essais de culture, d'après les méthodes de Löwenstein et de Petroff, principalement avec le dépôt de centrifugation du lait. Nous avons employé l'acide sulfurique à 10 p. 100 et à 15 p. 100 en le laissant en contact avec le culot de centrifugation un temps variant entre vingt et trente minutes, à la température du laboratoire ou à 38°. Quelquefois, on agitait le mélange culot-acide sulfurique pendant dix à quinze minutes à l'agitateur électrique. Le culot était ensuite neutralisé avec de la soude ou ensemencé tel quel après égouttement des tubes à centrifugation sur papier buvard.

Il a été procédé de même avec la soude à 4, 6 ou 30 p. 100 sans plus de succès.

On a traité ainsi avec l'acide sulfurique à 10 ou 15 p. 100, avec ou sans neutralisation à la soude :

Echantillons de lait	14
Echantillons de beurre	2
Echantillons de crème	3
Echantillons de fromage	2

avec la soude à 4, 6 ou 30 p. 100, avec ou sans neutralisation du culot :

Echantillons de lait	6
Echantillon de beurre	1
Echantillon de crème	1
Echantillons de fromage	3

De 8 ou 10 tubes ensemencés, il n'en restait généralement qu'un ou deux qui ne fussent pas infectés.

La méthode que nous avons employée le plus souvent pour la culture est celle de Wolters et Dehmel à l'acide chlorhydrique à 15 p. 100 et à l'acide azotique à 15 p. 100, tant pour le lait que pour les produits dérivés du lait (beurre, crème, etc.). Nous avons suivi rigoureusement cette méthode pour nos cultures, mais nous avons fait des ensemencements sur le milieu de Löwenstein glycériné et surtout non glycériné et sur le milieu au jaune d'œuf, au sérum de cheval ou de bœuf et au bouillon glycériné à 5 p. 100, selon la formule de R. Laporte.

Nous avons traité par la méthode de Wolters et Dehmel :

Echantillons de lait	20
Echantillons de beurre	14
Echantillons de crème	9
Echantillons de fromage	7

En y ajoutant les divers essais de culture effectués selon les méthodes de Löwenstein et de Pétroff, nous obtenons le total de 83 essais de culture.

Détail de la méthode employée.

Lait.

On centrifuge 200 à 300 cent. cubes de lait à 2.000-2.500 tours pendant trente minutes. Le dépôt, rarement très abondant, est recueilli en totalité, ainsi que la moitié ou le tiers de la crème restée à la surface. On mélange le tout dans un verre stérile et on porte au bain-marie à 40°. Le mélange est émulsionné dans 10 ou 15 cent. cubes d'eau physiologique. La plus grande partie est inoculée par voie sous-cutanée à raison de 2 à 5 cent. cubes par animal, à 2 ou 3, quelquefois 4 cobayes. Le reste du dépôt subissait les traitements variés dont nous avons parlé précédemment, avant d'être ensemencé.

Sur 25 inoculations, faites avec les dépôts de 25 échantillons de lait, 18 l'ont été sans traitement préalable du culot de centrifugation ; les 7 autres après traitement, soit par la soude, soit par l'acide sulfurique. Dans 19 cas, en même temps que l'inoculation, on a fait aussi la culture.

Quand on procédait seulement à la culture, on n'employait que 30 c. c. de lait pour la centrifugation, le dépôt en ce cas étant plus que suffisant pour l'ensemencement. Quelquefois, on ensemençait le dépôt seul ou bien le mélange dépôt-beurre, d'autres fois on ensemençait le dépôt et le beurre séparément.

Beurre. — Pour l'isolement du bacille tuberculeux, à partir du beurre, nous avons employé la méthode déjà utilisée par Goyal et Obermann.

40 à 70 cent. cubes de beurre (le plus souvent 60 cent. cubes) fondu à 40° sont émulsionnés dans de l'eau physiologique, en remuant constamment avec une baguette stérile. L'émulsion est ensuite centrifugée à 2 200-3.600 tours. On émulsionne le dépôt dans de l'eau physiologique et on l'inocule à des cobayes presque en totalité, une partie servant pour la culture. Nous inoculions soit le dépôt seul à 2 cobayes et à 2 autres la matière grasse seule, soit le mélange matière grasse et dépôt.

On a inoculé ainsi : deux fois le culot de centrifugation, quatre fois le culot à deux cobayes, et le culot + matière grasse à deux autres, une fois la matière grasse seulement, une fois la matière grasse à deux cobayes et le culot + matière grasse à deux autres.

Crème.

30 à 60 cent. cubes de crème sont soigneusement émulsionnés dans de l'eau physiologique stérile, en agitant vigoureusement le mélange avec une baguette de verre stérile. Pour avoir une émulsion très homogène, on emploie jusqu'à 100 cent. cubes d'eau physiologique. On centrifuge ensuite cette émulsion pendant trente minutes à 2 000 tours.

On a inoculé le plus souvent le dépôt seul (12 fois) et deux fois seulement le dépôt et la matière grasse surnageante, cela sans traitement préalable, à 2 ou 4 cobayes.

Cinq fois, on a fait en même temps des cultures, en traitant le culot de centrifugation, soit selon la méthode de Petroff (2 fois), soit par l'acide sulfurique à 15 p. 100 à l'agitateur électrique et en ensemençant sans neutraliser (3 fois).

9 échantillons ont été éprouvés seulement par la culture, sept fois par la méthode de Wolters et Dehmel, deux fois par la méthode de Hohn.

Fromage. — Pour les fromages, nous avons employé de grosses quantités de produit.

40 à 60 grammes de fromage sont soigneusement broyés dans un mortier en ajoutant progressivement de l'eau physiologique stérile. On centrifuge ensuite l'émulsion à 2.000 tours ; le dépôt est toujours très abondant et une couche épaisse s'accumule à la surface. On prélève la totalité du dépôt et une partie de la couche superficielle qu'on émulsionne dans 20 à 25 centimètres cubes d'eau physiologique et que l'on inocule à 4 cobayes à raison de 4 ou 5 cent. cubes par animal.

Les cobayes supportent bien cette inoculation, l'émulsion se résorbant très vite, sans donner, comme le beurre, des réactions inflammatoires étendues et souvent mortelles. Il est rare que la flore microbienne du fromage soit aussi abondante que celle du lait et des crèmes.

Pour la culture on prend 10 à 12 cent. cubes du produit que l'on broie dans un mortier, soit avec de la soude à 4 p. 100 qui dissout parfaitement la caséine — mais ne détruit pas le *B. subtilis*, même après un contact de trente minutes à 38° — soit avec de l'acide sulfurique à 15 p. 100.

Pour empêcher la formation de gros grumeaux, on emploie de petites quantités d'acide ajoutées goutte à goutte pour obtenir l'émulsion initiale. On centrifuge pendant dix minutes à 3.000 tours. Le dépôt est émulsionné de nouveau dans quatre fois son volume d'acide et agité pendant un quart d'heure. On le centrifuge ensuite rapidement. La durée totale de l'opération, y compris le contact avec l'acide, ne dépasse pas trente-cinq à quarante minutes. On ensemence le dépôt généralement sans le laver, mais on égoutte les tubes qui le contiennent.

Trois échantillons seulement de fromages ont été inoculés à des cobayes, 2 sans traitement préalable, 1 après traitement par la soude à 4 p. 100; une fois on a fait en même temps la culture.

Les autres échantillons de fromage (12) ont été cultivés : 7 par la méthode de Wolters et Dehmel, 2 après traitement par l'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant trente minutes — suivi de neutralisation, dans 1 cas ; sans neutralisation dans 1 autre cas — trois fois selon la méthode de Petroff.

Yoghourt

30 cent. cubes de yoghourt environ (crème et caséine) sont intimement mélangés dans un mortier avec environ 60 cent. cubes de soude à 4 p. 100. On laisse le mélange pendant trente minutes à 38° et on le centrifuge à 2.800 tours. On lave le culot deux fois avant l'inoculation ou on le neutralise par l'acide sulfurique à 15 p. 100. Le dépôt et la crème ont été inoculés à 4 cobayes. Il n'a pas été fait de culture.

Résultats des inoculations et des cultures.

Ces résultats sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau I.

PRODUITS examinés	INOCULATION	NOMBRE de cas positifs	INOCULATION et culture	NOMBRE de cas positifs	CULTURE seulement	NOMBRE de cas positifs	TOTAL des échantillons examinés	TOTAL des cas positifs
Lait	25	0	19	0	20	0	45	0
Beurre	8	1	4	0	14	0	22	1
Crème	14	4	5	0	8	0	22	4
Fromage . . .	3	0	1	0	10	0	13	0
Yoghourt . .	8	1					8	1

Si on examine ce tableau, on remarque que des *45 échantillons de lait* examinés, soit par inoculation au cobaye seulement, soit par l'inoculation et la culture, soit par la culture seule, aucun ne contenait de bacilles tuberculeux.

D'un cobaye inoculé avec l'échantillon *L 21* on a isolé un bacille paratuberculeux ayant l'aspect du *Grasbacillus* de Möller : culture rugueuse, rapide sur tous les milieux, même dans le bouillon et la gélose ordinaires, colonies de couleur légèrement orangée, aucune virulence pour le cobaye, etc.

Sur *22 échantillons de beurre*, un seul *B 14* était infecté par des bacilles tuberculeux. Le bacille a été isolé de 2 cobayes inoculés avec le dépôt de 60 cent. cubes de beurre.

Le premier cobaye est mort le vingt-huitième jour après l'inoculation avec les ganglions correspondants (inguinaux et sous-lombaires) hypertrophiés et présentant un début de caséification. L'ensemencement des organes broyés a donné

très tardivement, après deux mois, des colonies isolées, rondes, petites, proéminentes, lisses.

Le second cobaye est mort après un mois, avec des lésions plus avancées. Cette souche, de virulence moyenne, a été identifiée au type bovin par inoculation intraveineuse au lapin.

De *15 échantillons de fromages* examinés, on n'a isolé aucun bacille acido-résistant.

Au contraire, les *crèmes* se sont montrées souvent infectées : de *22 échantillons* on a isolé quatre fois un bacille tuberculeux (C1, C3, C6, C15).

La souche *C 1* a été isolée d'un cobaye inoculé avec le dépôt de centrifugation et la matière grasse. Le cobaye est mort au bout de trois mois et demi de tuberculose généralisée. La culture du pus de l'abcès local et de la rate fut positive après six semaines. Inoculée par voie veineuse à la dose de 0 milligr. 01, elle tuait le lapin en six semaines, avec des lésions tuberculeuses massives des poumons.

La souche C3 a été isolée d'un cobaye mort environ trois mois après l'inoculation du culot de centrifugation de 30 c. c de crème. Des organes de ce cobaye, qui présentait des lésions tuberculeuses peu avancées, on a obtenu une culture lisse, tardive (quarante jours). Inoculée à la dose de 0 milligr. 01 par voie veineuse à 2 lapins, cette souche a provoqué chez le premier, au bout d'un mois, une tuberculose pulmonaire, à granulations miliaires ; chez le second, une tuberculose généralisée en sept semaines.

La souche C6 a été isolée d'un cobaye mort quatre mois et demi après l'inoculation d'un dépôt de crème, avec des lésions de tuberculose généralisée. La culture des organes fut positive après un mois, sous forme de petites colonies, en gouttes de rosée à peine visibles. Cette souche, très dysgonique, a été identifiée au type bovin par inoculation au lapin.

Le cobaye dont on a isolé la *souche C15* avait été inoculé avec le dépôt de centrifugation d'un échantillon de crème. Il est mort vingt-huit jours après. Le broyage du mélange de tous les organes a donné très tardivement (trois mois et quelques jours) des colonies arrondies, isolées (1 colonie sur 1 tube, 3 sur l'autre). La souche ainsi obtenue est très dysgo-

nique Elle provoque chez le lapin, en deux mois, une tuberculose généralisée à la dose de 1/100 de milligramme.

De *8 échantillons de yoghourt* on a isolé une seule fois un bacille tuberculeux de type, bovin virulent : un des cobayes inoculé avec *l'échantillon Y 7* étant mort quelques jours après l'inoculation, nous avons ensemencé ses organes sur des tubes de milieu à l'œuf. Six semaines après, on a observé sur un seul tube une colonie arrondie. Cette colonie émulsionnée dans 2 cent. cubes d'eau physiologique, a été inoculée à 1 lapin par voie veineuse et à 1 cobaye par voie sous-cutanée.

Le lapin est mort un mois après et le cobaye fut sacrifié après le même délai. Tous deux présentaient des lésions miliaires généralisées.

Considérations générales.

Ce qui frappe quand on considère les résultats des recherches effectuées en France (tableau II), c'est la faible proportion des cas positifs en ce qui concerne la présence du bacille de Koch dans le lait. Sur 45 échantillons étudiés par nous, aucun n'a donné de culture, aucun n'a tuberculisé le cobaye.

Tableau II.

Noms des auteurs	Lait	Nombre de cas positifs	Beurre	Nombre de cas positifs	Crème	Nombre de cas positifs	Fromage	Nombre de cas positifs	Yoghourt	Nombre de cas positifs
Balthazard et Aly-Zaky	30	0								
R. Goyal et F. Obermann			16	1			15	0		
A. de Grolier et Th. Voiculesco	45	0	22	1	22	4	13	0	8	1
R. Legrand, Ch. Gernez, R. Crampon et E. Lefort	75	4								
W. Sarnowiec (1)	14	1	11	1			10	1		
M. Warnery	30	2								
Total	194	7	49	3	22	4	38	1	8	1
Pourcentages	3,61		6,12		18,8		2,63		12,5	

(1) On n'a tenu compte que des isolements obtenus de produits frais.

Cela tient, croyons-nous, à ce que le lait vendu aux consommateurs parisiens est, dans la plupart des cas, pasteurisé avant d'être livré à la consommation.

Sans atteindre les chiffres de E. Y. Pullinger (51,6 p. 100), le pourcentage des crèmes infectées, trouvé par nous, est assez élevé (18,8 p. 100). Il apparaîtrait plus élevé encore (28,8 p. 100), si, en éliminant les 8 échantillons éprouvés par la culture, méthode incertaine, on le calcule seulement sur 14 échantillons étudiés par l'inoculation au cobaye, méthode d'investigation plus sûre. C'est par cette méthode que nous avons obtenu les 4 souches isolées des crèmes.

L'inoculation du culot de centrifugation seule a été suffisante pour l'isolement des bacilles tuberculeux des crèmes et du beurre.

La matière grasse du lait, des crèmes et du beurre se résorbe mal dans le tissu conjonctif du cobaye, l'inoculation est souvent suivie d'accidents mortels, précoces, d'ordre infectieux. Au contraire, le culot, même quand il renferme une nombreuse flore microbienne, si elle n'est pas particulièrement virulente, est facilement résorbé en quelques jours. Sur 97 cobayes inoculés avec le dépôt de centrifugation et le beurre du lait, nous avons perdu 24 animaux en quelques jours après l'inoculation, 2 seulement parmi les cobayes inoculés avec le dépôt seul Quand d'un échantillon de beurre nous avions inoculé le dépôt et la matière grasse, les animaux mouraient très vite, tandis que ceux du même lot inoculés avec le dépôt seul restaient vivants.

Nous avons toujours inoculé le culot de centrifugation de grandes quantités de produit ; par exemple le culot de 200-250 cent. cubes de lait a été inoculé à 3 ou 4 cobayes, ce qui correspond à 60 cent. cubes de lait par cobaye. S. Delépine inoculait le dépôt de 20 cent. cubes de lait par cobaye ; W. J. Savage le dépôt de 200 cent. cubes ; la Commission Royale environ 10-30 cent. cubes de lait non centrifugé ou le dépôt de 40 cent. cubes de lait ; S. R. Gloyne le dépôt de 50 cent. cubes ; E. Y. Pullinger celui de 100 cent. cubes de lait, plus 1 cent. cube de crème ; M. Warnery de 20 à 25 cent. cubes ; B. Ananiadès et M. Papanarghyrou 20 cent. cubes, etc., etc.

Il est très important aussi de ne pas sacrifier les animaux trop tôt car, en général, d'après nos observations, la tuberculose chez le cobaye se développe assez lentement, probablement parce que le dépôt inoculé contient peu de bacilles. Il faut aussi toujours prendre la précaution d'ensemencer les organes des animaux morts précocement. Les souches C 1 et Y 7 ont été isolées, la première d'un cobaye mort le vingt-huitième jour, alors qu'il ne présentait qu'une légère hypertrophie ganglionnaire, la seconde d'un cobaye mort le sixième jour après l'inoculation.

En ce qui concerne la culture directe, il semble qu'il soit nécessaire de la pratiquer sur une grande échelle pour obtenir quelques résultats positifs. P. Ruddock-West et F. P. Alpe ont examiné 705 échantillons de lait par culture et ont obtenu 45 résultats positifs (4,9 p. 100) ; S. R. Gloyne 300 avec 7 échantillons positifs (2,33 p. 100) ; K. L. Wolters et H. Dehmel 400 avec 16 résultats positifs (4 p. 100).

Sur 83 essais de culture, dont 50 par la méthode de Wolters et Dehmel, nous n'avons obtenu aucune culture.

La méthode de choix reste l'inoculation au cobaye. Chaque fois qu'on a fait comparativement l'inoculation et la culture, le pourcentage des cas positifs, décelé par l'inoculation, dépassait celui obtenu par la culture seule. Ainsi K. L. Wolters et H. Dehmel, sur 234 échantillons de lait du commerce, obtiennent 4 cas positifs de plus par l'inoculation ; sur 20 isolements de bacilles bovins, obtenus par ces auteurs, *14* l'ont été par l'inoculation seule, *4* par l'inoculation et la culture et *2* par la culture seule.

Résumé et conclusions.

En recherchant la présence du bacille tuberculeux dans 45 échantillons de lait, 22 de beurre, 22 de crème, 13 de fromage et 8 de yoghourt, au total 110, nous avons réussi à isoler six fois des bacilles bovins virulents ; une fois du beurre, quatre fois de la crème, une fois du yoghourt.

Dans les 45 échantillons de lait examinés, nous n'avons trouvé aucun bacille tuberculeux. Un bacille paratuberculeux a été cultivé.

L'absence de bacilles tuberculeux dans le lait est due probablement à la pasteurisation préalable de cet aliment avant qu'il soit livré au consommateur parisien.

De deux méthodes employées pour la recherche du bacille tuberculeux dans le lait et les produits dérivés, la culture et l'inoculation, celle-ci est la méthode de choix.

BIBLIOGRAPHIE

[1] B. Ananiades et U. Papanarghyrou. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 776

[2] Balthazard et Aly-Zaky. *Congrès intern. de la Tuberculose*, 1906, p. 209.

[3] H. D. Boër. *Meded. Inst. praevent. Genlesek*, 1934, p. 90.

[4] M. Gervois. Le bacille de type bovin dans la tuberculose humaine. Revue de la documentation actuelle. *Thèse* 1937, Lille.

[5] L. Rodhouse Gloyne. *Tubercle*, **13**, 1932, p. 443-450 et 448-498.

[6] R. K. Goyal et Mlle Obermann. *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 306.

[7] R. Legrand, Ch. Gernez, P. Crampon et F. Lefort. *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 204.

[8] A. Lumière et Mlle Dubois. *C. R. Acad. Sc.*, **192**, 1931, p. 21.

[9] Raoul Palacios et Juan de D. Rojas. *Rev. Inst. Bact. Chile*, **4**, 1933, p. 25. Réf. : *Zbl. f. die Ges. Tbk. Frschg.*, **40**, 1934, p. 600

[10] E. Piasecka-Zeyland. *Gruzlica*, **11**, 1936, p. 445-448. Réf. : *Zbl f. die Ges. Tbk. Frschg.*, **46**, 1937, p. 318.

[11] R. M Price. *Canada publ. Health Jl.*, **25**, 1934, p. 13.

[12] E. J. Pullinger. *The Lancet*, 1934, p. 967.

[13] T. Ruddock-West et F. T. Alpe. *Jl. St. med.*, **44**, 1936, p. 543-545.

[14] W. Sarnowiec. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 370.

[15] M. Warnery. *Rev. Tuberc.*, **1**, 1933, p. 959.

[16] K. L. Wolters et H. Dehmel. *Ztschr. Infektionskr Haustiere*, **39**, 1931, p. 102

SUR LA PRÉPARATION DE MEMBRANES ULTRAFILTRANTES

par P. GRABAR et J. A. DE LOUREIRO.

(*Institut Pasteur.*)

Les membranes en nitrocellulose de porosité graduée peuvent rendre et ont déjà rendu de grands services dans l'étude des protéides, des enzymes, des virus, etc. [8, 11]. Pour obtenir une membrane ultrafiltrante on transforme une solution de nitrocellulose en un gel, c'est-à-dire en un système rigide possédant des interstices remplis de liquide, ce dernier pouvant être déplacé pendant la filtration. On sait que les membranes obtenues par évaporation de solutions de nitrocellulose dans des solvants volatils ont une structure plus régulière que celles obtenues par précipitation des collodions acétiques [4]; nous nous limiterons donc à l'étude des premières.

Asheshov [1] a indiqué que des membranes de diverses porosités peuvent être obtenues par l'addition de petites quantités d'acétone ou d'alcool amylique à une solution-mère de nitrocellulose dans de l'alcool-éther. Elford [5] a adopté ce principe et a mis au point une excellente technique de préparation de membranes. Elles sont connues sous le nom de membranes Gradocol et ont servi au cours de ces dernières années à de très nombreuses études. Pour préparer ces membranes on part d'une solution-mère de nitrocellulose contenant de l'alcool éthylique, de l'éther, de l'acétone et de l'alcool amylique, à laquelle on ajoute, pour faire varier la porosité des membranes, de petites quantités de divers liquides. Elford, Grabar et Ferry [6] ont essayé d'expliquer les variations de porosité par l'action antagoniste des solvants et des précipitants de la nitrocellulose dans le mélange. Mais cette explication ne permet pas de se rendre compte du mécanisme intime de la formation de membranes de diverses porosités. Or, il serait utile

d'avoir des connaissances plus précises afin d'éviter l'empirisme qui prévaut dans les techniques de préparation des membranes.

Grabar et Nikitine ont montré que les membranes Gradocol, tout en étant les plus homogènes parmi les ultrafiltres connus, possèdent néanmoins une dispersion non négligeable dans la grandeur des diamètres de leurs pores [**14**]. L'emploi de l'ultrafiltration pour la purification, l'isolement ou la mesure de particules submicroscopiques est de ce fait limité, et l'interprétation des résultats obtenus par l'ultrafiltration est rendue délicate [**12**].

L'examen de préparations microscopiques de ces ultrafiltres nous a permis de voir que la variation de leur porosité dépend des dimensions des agrégats de nitro-cellulose qui les composent [**13**]. Nous avons ainsi été amenés à étudier les facteurs qui peuvent avoir une action sur les dimensions de ces agrégats, en essayant en même temps d'élaborer une technique moins empirique et pouvant donner des membranes plus homogènes, ayant une dispersion plus restreinte dans les grandeurs des diamètres de leurs pores.

Nous avons tout d'abord étudié la gélification de solutions de nitrocellulose dans un mélange de deux liquides (chapitre I); nous avons ensuite essayé d'établir pour les solvants organiques usuels une classification d'après les effets qu'ils peuvent produire sur la structure et la porosité des membranes (chapitre II) ; ces études nous ont permis d'indiquer les principes d'une technique de préparation de membranes homogènes de toutes les porosités (chapitre III).

CHAPITRE I

Gélification des solutions de nitrocellulose dans des mélanges de deux liquides.

Afin de faciliter l'exposé, voici les définitions de quelques termes que nous utiliserons fréquemment :

1° Nous appelons *un solvant* un liquide capable de donner avec la nitrocellulose un système parfaitement fluide, et *un gélifiant* un liquide

capable de former des gels et de gonfler des agrégats secs de nitrocellulose sans changer leur structure (voir chapitre II pour plus de détails).

2° Sous les expressions de « gonflement du gel » (G_v) et « gonflement de la membrane » (G_m) nous entendons le rapport liquide/solide (en poids) dans les gels ou membranes.

3° La porosité des membranes est exprimée par le « diamètre moyen des pores » (2 R, en mμ). Cette donnée ne correspond pas au diamètre moyen réel [14], mais elle permet une simple classification des membranes d'après leurs porosités relatives.

Un collodion ordinaire a au moins trois constituants : la nitrocellulose, un solvant et un gélifiant. Si ce dernier est le moins volatil, le mélange, en s'évaporant, s'appauvrit progressivement en solvant et le système se transforme en gel. Il est évident qu'on ne peut pas employer un gélifiant (dont le représentant typique est l'alcool éthylique) seul, puisque ces liquides ne dissolvent pas les nitrocelluloses employées pour la préparation des membranes ultrafiltrantes. L'évaporation d'une solution de nitrocellulose dans un de ces solvants aboutit bien à la formation d'une membrane, mais le système ne devient rigide que lorsque tout le solvant a été évaporé et la membrane est pratiquement imperméable, ce n'est pas un gel. Il s'ensuit que le système le plus simple pouvant donner un gel perméable est un système ternaire, comme l'est le collodion à l'alcool-éther ordinaire. L'emploi d'autres solvants peut modifier certaines propriétés des membranes, mais le mécanisme général de leur formation reste le même.

Nous ne reviendrons pas sur l'énumération des divers facteurs ayant une action sur la porosité finale d'un ultrafiltre, ainsi que sur le fait bien connu que l'on peut obtenir des membranes de diverses porosités en faisant varier certains de ces facteurs (1)

On peut envisager la préparation des membranes comme étant constituée par deux périodes : dans la première, la solution est amenée à l'état d'un gel et, au cours de la deuxième, ce gel est transformé en une membrane. La structure de cette dernière est fixée surtout pendant la première période ; il est en effet difficile d'imaginer un réarrangement important des

(1) Voir par exemple [8] et [10].

agrégats de nitrocellulose dans le gel déjà formé, à condition de ne pas le soumettre à des traitements trop violents. Comme nous allons le voir, son gonflement est modifié par le lavage et la stérilisation, mais la structure fondamentale ne doit pas être atteinte. Il en résulte que l'obtention de membranes homogènes, c'est-à-dire ayant des pores de dimensions uniformes, dépend surtout de la régularité de la structure du gel et que, par conséquent, ce sont les facteurs agissant au cours de la formation du gel qui sont importants Parmi ces facteurs, la composition de la nitrocellulose, la température et l'humidité atmosphérique ont des effets difficiles à contrôler et il est préférable de les maintenir aussi constants que possible. Nous nous arrêterons, par contre, sur la discussion des effets des variations de la vitesse d'évaporation et de la composition des solutions de nitrocellulose.

A. — Vitesse d'évaporation.

Lorsque l'on observe une solution de collodion en évaporation à l'air libre, on voit, à la surface du liquide, des figures polygonales Ces figures qui subsistent même après la formation du gel, correspondent aux « tourbillons de Bénard » [**2**] et sont dues aux colonnes ascendantes de vapeurs ; ces tourbillons disparaissent lorsque l'on arrête l'évaporation, en couvrant la solution avec une plaque en verre par exemple. Ces tourbillons produisent des différences locales dans la composition du liquide (et, surtout, dans la fixation de l'humidité atmosphérique) entre le centre et la périphérie des figures polygonales. Il en résulte des irrégularités dans la structure du gel, comme nous avons pu l'observer sur des préparations microscopiques et sur des membranes au cours de leur séchage [**13**]. Nous croyons que ces irrégularités jouent un rôle important dans la « dispersion dans la grandeur des diamètres » des pores, puisqu'il est logique d'admettre qu'à ces irrégularités de structure correspondent des porosités différentes.

Pour obtenir des gels plus réguliers, il faut donc atténuer la formation des « tourbillons de Bénard » en diminuant la vitesse de l'évaporation. Ce but peut être atteint en évitant l'emploi de solvants trop volatils et en couvrant le liquide en évaporation

par des couvercles plus ou moins perméables qui ralentissent le départ des vapeurs des solvants.

Si l'évaporation est suffisamment lente, la solution en évaporation peut être considérée, en première approximation, comme ayant à chaque moment une composition homogène. Dans ces conditions, la gélification doit être un phénomène pour ainsi dire instantané, qui correspond à une certaine composition définie du système en évaporation. Nous avons pu observer des gélifications de certaines membranes, où cette transformation est accompagnée d'opacification, et constater qu'elle se produit uniformément et rapidement. Ainsi donc, il y a, dans le processus de l'évaporation, une discontinuité nette au moment de la gélification et la composition du système est à ce moment fonction de la composition du liquide initial (voir plus bas).

B. — Composition de la solution initiale.

Lorsque l'on soumet à l'évaporation du collodion à l'alcool-éther, par exemple, les proportions relatives des trois constituants changent graduellement. Mais il serait erroné de croire qu'au moment de la gélification le système est constitué uniquement par la nitrocellulose et de l'alcool, car il y reste un peu d'éther et, comme nous allons le voir, cette petite quantité de solvant joue un rôle important. Le gel a donc au moins trois constituants, et nous disons « au moins » puisqu'il y a encore un quatrième constituant : l'eau provenant, d'une part, des liquides employés et, d'autre part, de la fixation de l'humidité atmosphérique. Pour simplifier, nous ne tiendrons pas compte, dans ce qui suit, de ce quatrième constituant en admettant que son action reste constante. Cette manière de voir est justifiée lorsque l'humidité atmosphérique n'est pas trop élevée et l'évaporation suffisamment lente pour ne pas provoquer une forte baisse de la température du liquide en évaporation.

On admet, d'une manière générale, qu'une augmentation de la teneur de la solution initiale en gélifiant (généralement alcool éthylique), donc une diminution du rapport solvant/gélifiant, a pour effet de donner des membranes plus poreuses. Il est évident que plus la proportion en alcool du liquide initial est

grande, plus le gel, au moment de sa formation, sera riche en liquide. On considère que la totalité du liquide contenu dans une membrane correspond au volume occupé par les pores, il semblerait donc que plus le gonflement d'une membrane est grand, plus elle devrait être poreuse. Mais cette explication est insuffisante. Nous avons pu montrer [**13**], par des examens microscopiques de membranes Gradocol ayant une teneur en eau presque constante, mais des porosités allant depuis $2R = 3.000$ mμ jusqu'à environ 100 mμ, que c'est la dimension des agrégats de nitrocellulose qui est le facteur principal, responsable des diverses porosités. Nous croyons que dans les systèmes ternaires, plus simples que les mélanges utilisés dans la fabrication des membranes Gradocol, il en est de même et que la composition du liquide initial affecte non seulement le gonflement de la membrane, mais aussi les dimensions des agrégats de nitrocellulose Cette manière de voir est corroborée par l'expérience suivante : on prépare, en partant de solutions de nitrocellulose, dans des mélanges d'acétone et d'alcool propylique de proportions différentes, deux membranes A et B, en ayant soin d'arrêter l'évaporation au moment de la gélification, et une troisième membrane C à partir de la solution qui a servi pour préparer la membrane A, mais en laissant l'évaporation se poursuivre après la gélification, de manière à ramener le gonflement à un taux voisin de celui de la membrane B. Les résultats des mesures des porosités de ces membranes (tableau I) montrent que le diamètre moyen des pores (2 R) de la membrane C est bien différent de celui de la membrane B, tandis que le volume total des pores de ces deux membranes est sensiblement le même. Elles ne peuvent donc se différencier que par la distribution spatiale de la substance solide, ou, en d'autres termes, par la grandeur des agrégats de nitrocellulose. Or, il semble que l'unique différence essentielle dans le mécanisme de la formation de ces membranes ne peut être que la composition des systèmes au moment de leur transformation en gel.

Nous avons cherché à obtenir des données expérimentales sur ce point, en faisant des analyses chimiques de gels, suivies de déterminations des porosités des membranes correspondantes. Nous nous sommes adressés à des solutions de nitro-

cellulose dans des mélanges d'alcool propylique et d'acétone qui présentent plus de facilité au point de vue analytique que des systèmes contenant de l'alcool et de l'éther. Or, les variations de la composition des solutions de nitrocellulose dans ces solvants, modifient la porosité et le gonflement des

TABLEAU I.

	MEMBRANES		
	A	B	C
Composition des solutions initiales, en p. 100, en poids :			
Nitrocellulose	4	4	4
Alcool propylique	30	20	30
Acétone	66	76	66
Durée de l'évaporation	Jusqu'à la gélification.		Prolongée au-delà de la gélification
G_m	3,8	2,5	2,3
2R (en mμ)	248	68	250

Remarque : Les membranes préparées avec des solutions de cette composition deviennent imperméables à l'eau si l'évaporation a été trop longue ; il est probable que l'air entre dans les pores. La perméabilité peut être restaurée si l'on traite la membrane par de l'alcool isobutylique. Dans cette expérience, il n'y avait que la membrane C qui devait être traitée de cette manière, mais pour avoir des résultats bien comparables nous avons fait subir l'action de l'alcool isobutylique aux trois membranes d'une manière identique (ce traitement n'affecte pas la structure).

TABLEAU II.

	NUMÉROS DES MEMBRANES		
	31	32	33
Composition des solutions initiales, en p. 100, en poids :			
Nitrocellulose	4	3,8	4
Alcool éthylique	76	57,5	20
Ether	20	38,5	76
Rapport $\frac{\text{Ether}}{\text{Alcool}}$	0,26	0,67	3,8
Rapport $\frac{\text{Alcool}}{\text{Nitrocellulose}}$	19	15	5
Membranes :			
Gonflement G_m	7,3	5,9	3,0
2R (en mμ)	31,4	26,2	13,6

membranes dans le même sens que dans les systèmes à l'acétone (tableaux II et III). Il en est d'ailleurs de même pour des systèmes contenant d'autres solvants (tableaux VII et IX).

a) *Analyses chimiques des gels.*

1° TECHNIQUE. — Les membranes ont été préparées en laissant évaporer des solutions de nitrocellulose dans des cellules en verre optiquement plan dans une chambre à évaporation, maintenue à 22°5 [**10**].

On prépare une solution-stock de nitrocellulose (« Orthonitrocellulose pour ultrafiltration » de la Droguerie Jost, Strasbourg) à 10 p. 100 dans de l'acétone ; à 40 grammes de cette solution-stock, on ajoute les quantités nécessaires d'acétone et d'alcool propylique jusqu'au poids total de 100 grammes. On obtient ainsi une série de solutions à 4 p. 100 de nitrocellulose ayant des proportions différentes d'acétone et d'alcool propylique. Des expériences préliminaires nous ont montré qu'avec cette nitrocellulose, la concentration de 4 p. 100 était la plus convenable. 39 à 40 cent. cubes de ces solutions ont été employés pour faire des membranes de 20 centimètres de diamètre. La cellule à évaporation est couverte par un couvercle (dont la partie supérieure est constituée par du papier-filtre) afin de ralentir l'évaporation. Cette dernière est poursuivie jusqu'à l'opacification, indice de la formation du gel. A ce moment, on découpe rapidement des fragments du gel que l'on place dans des pèse-filtres contenant 25-30 cent. cubes d'eau et ayant été tarés au préalable. On bouche immédiatement les pèse-filtres et on les pèse. Les échantillons de gels prélevés ont été d'environ 2 grammes pour les gels très riches en liquide et de 0 gr. 3 pour les gels pauvres en liquide.

La cellule à évaporation, avec le reste du gel, est plongée dans l'eau aussi vite que possible après le prélèvement de ces échantillons, de manière à obtenir des membranes correspondant aussi exactement que possible aux échantillons du gel prélevé. Sur ces membranes, on détermine l'épaisseur, la teneur en eau et le diamètre moyen des pores, d'après les techniques usuelles [**10**].

Le contenu des pèse-filtres (liquide et débris de nitrocellulose) est transvasé dans un ballon, après avoir été refroidi dans de la glace afin d'éviter des pertes d'acétone par volatilisation. On rince le pèse-filtre à l'eau distillée, également refroidie, et les eaux de lavage sont versées dans le même ballon jusqu'à un volume total d'environ 100 cent. cubes. On distille cette solution dans un appareil de Schloesing-Aubin en recueillant le distillat dans un ballon-jaugé de 25 cent. cubes. Des expériences préliminaires nous ont montré, en effet, que la totalité de l'acétone est recueillie lorsqu'un quart du volume total est distillé.

On dose l'acétone, sur une partie aliquote du distillat, par la méthode de Fleury et Awad [**9**] (précipitation par le réactif de Nessler, centrifugation et lavage du précipité, dissolution du précipité, titrage iodométrique). Nous avons choisi cette méthode parce que les résultats des dosages sont exacts, même en présence de grandes quantités d'alcool propylique. Le résidu de distillation restant dans le ballon à distillation contient la totalité des débris du gel ; on les recueille quantitativement

sur un filtre taré en verre fritté d'Iéna ; on les lave soigneusement, on les sèche à 60° d'abord et dans le vide ensuite, et on les pèse. On obtient ainsi le poids de la substance sèche (nitrocellulose) dans l'échantillon du gel qui a servi à la détermination de l'acétone. Les teneurs en alcool propylique + eau sont calculées par différence. Dans chaque expérience, ces déterminations ont été faites sur deux échantillons du gel, et au moins deux dosages d'acétone ont été effectués sur chaque distillat, ce qui fait quatre dosages d'acétone par membrane.

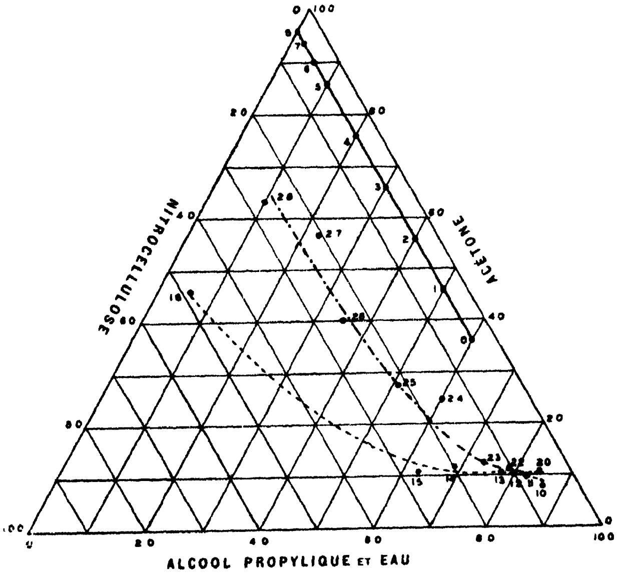


FIG. 1. — Composition des solutions initiales et des gels.
————, solutions initiales; — — — —, gels, série 10; —·—·—·, gels, série 20.

2° RÉSULTATS. — Nous avons fait des déterminations de ce genre sur deux séries de membranes obtenues en partant de solutions dont les proportions relatives d'acétone et d'alcool propylique variaient progressivement. Dans le tableau III et la figure 1, qui résument nos résultats, les séries ont été numérotées en commençant par 10 et par 20, tandis que les unités désignent les diverses membranes de chaque série et les numéros des solutions initiales correspondantes.

L'erreur expérimentale, qui pourrait paraître assez importante dans ces expériences, n'est pas due aux dosages chimiques qui sont assez exacts, mais à l'évaporation du gel

TABLEAU

	NUMÉROS DES				
	10	20	11	12	22
Composition des solutions initiales, en p. 100, en poids :					
Nitrocellulose	4		4	4	
Alcool propylique	60		50	40	
Acétone	36		46	56	
Rapport $\frac{\text{Acétone}}{\text{Alcool propylique}}$	0,6		0,9	1,4	
Rapport $\frac{\text{Alcool propylique}}{\text{Nitrocellulose}}$	15		12,5	10	
Temps d'évaporation, en minutes.	130	120	170	220	180
Humidité atmosphérique relative.	60	43	59	52	49
Composition du gel, en p. 100, en poids :					
Nitrocellulose	6,55	5,45	7,65	10,15	10,5
Alcool propylique + eau	85,75	84,2	82,15	79.75	78,5
Acétone	7,7	10,35	10,2	10,1	11,0
Gonflement du gel : G_g	14,4	17,3	12,1	8,8	8,5
Membranes :					
Épaisseur, en centimètres	0,035	0,035	0,024	0.018	0,017
2R, en mµ	4.630	2.980	2.820	1 520	724
Gonflement : G_m	6,4	6,8	5,9	4,1	4,3
Substances sèches par centimètre carré, en gramme : P_n	0,00360	0,00405	0,00396	0.00405	0.00450

pendant le prélèvement des échantillons et à des différences dans les conditions de l'évaporation, certaines de ces dernières étant difficiles à maintenir constantes (2). De ce fait, le temps nécessaire à la transformation en gel pouvait varier, et nous n'avons pas pu faire tous les prélèvements au moment précis de la gélification.

Malgré les écarts dans les valeurs trouvées dans certains cas, un fait semble se dégager de ces expériences : au fur et à mesure que la teneur en acétone de la solution initiale est augmentée, la teneur en acétone du gel croît, tandis que le gonflement du gel diminue. Ce dernier point confirme les observations antérieures, nous y reviendrons par la suite.

(2) Telles que : l'humidité atmosphérique, impuretés occasionnelles dans les solvants, composition de la nitrocellulose, âge de la solution de nitrocellulose.

III.

MEMBRANES									
13	23	14	24	15	25	26	27	18	28
4		4		4		4	4	4	
30		20		10		6	2	0	
66		76		86		90	94	96	
2,2		3,8		8,6		15	47		
7,5		5		2,5		1,5	0,5	0	
190	210	245	195	205	165	155	135	145	140
[illegible]2	65	47	60	4[illegible]	52	56	59	47	55
12,3	13,3	19,9	16,0	26,35	21,4	24,3	20,3	48.4	27,4
77,3	74,1	68,7	61,3	63,0	49,3	35,5	22,7	5,5	10,5
10.4	12,6	11,4	22,7	10,65	29,3	40,2	57,0	46,1	62,1
7,5	6,5	4,0	5,2	2,5	3,7	3,1	4,0	1,1	2,7
0,012	0,012	0,009	0,007	0,008	0,004	0,004	0,004	0,003	0,0035
420	375	46,3	[illegible],2	9,7	1,7	2,2	1,6	Imperm	Imperm.
2,6	2 65	1,47	1,47	1,65	0,7[illegible]	0,4	0,5	0,2	0,25
0 00394	0,00436	0,00454	0,00404	0,00342	0,00391	0,00423	0,00400	0,00420	0,00417

En ce qui concerne la teneur du gel en acétone, nous avons cherché à exprimer les résultats d'une manière plus nette en fonction de la composition du liquide initial. La teneur en nitrocellulose des solutions initiales étant constante, leur composition peut être définie par le pourcentage d'un des composants liquides, par exemple celui de l'acétone. Pour les gels, qui sont aussi des mélanges ternaires, mais où les proportions des trois composants varient, nous avons pris comme fonction de leur composition, leur teneur en acétone pour 100 parties d'alcool propylique. Ces données (tableau IV) montrent d'une manière très nette l'accroissement de la teneur des gels en acétone, en fonction de la teneur en ce corps des solutions initiales. Et ceci dans les deux séries d'expériences, bien que les nombres ne concordent point entre les deux séries. Nous avons pu nous rendre compte par le calcul, que l'accroisse-

ment observé des teneurs en acétone dans les gels n'est pas dû au hasard, puisqu'il dépasse de beaucoup l'erreur probable.

TABLEAU IV.

Teneur des solutions initiales en acétone, en p. 100, en poids	36	46	56	66	76	86
Teneur des gels en acétone (p. 100 d'alcool propylique), série 10	9,0	12,4	12,6	14,2	16,6	17,0
Teneur des gels en acétone (p. 100 d'alcool propylique) série 20	12,3	»	14,0	17,0	37,0	59,3

Nous pouvons donc conclure que l'augmentation du rapport

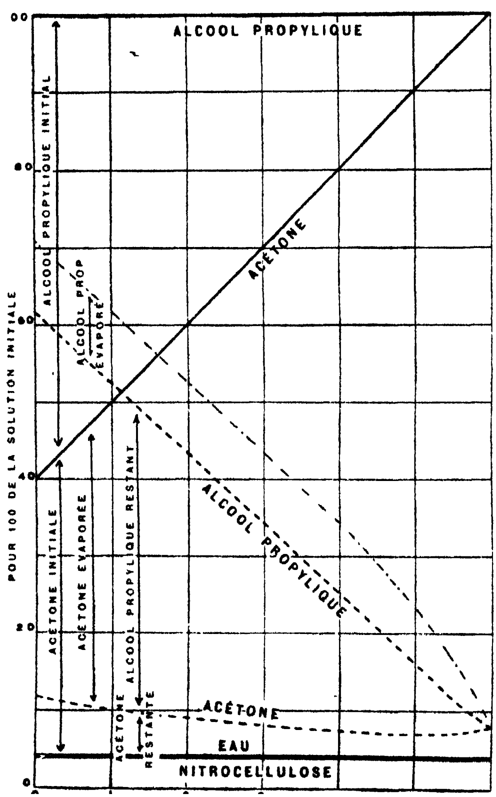


FIG. 2. — Teneurs en acétone, alcool propylique, nitrocellulose et eau des solutions initiales ——— et des gels — — — —, en p. 100 des solutions initiales; -·-·-·-, alcool propylique évaporé. Les teneurs en nitrocellulose et en eau ont été considérées comme constantes.

solvant/gélifiant dans la solution initiale augmente la proportion du solvant dans le liquide qui imbibe le gel.

Nous avons inclus dans le tableau III et la figure 1 les résultats d'expériences faites avec des solutions de nitrocellulose dans de l'acétone seule. Ces membranes, bien qu'opaques, ne sont pas perméables dans des conditions usuelles. Ces expériences présentent néanmoins quelque intérêt, puisqu'elles permettent de se rendre compte de la teneur en eau des gels. En effet, la somme des teneurs en acétone et en nitrocellulose est inférieure à 100 dans les deux séries d'expériences. Cette différence ne peut être due qu'à l'eau provenant

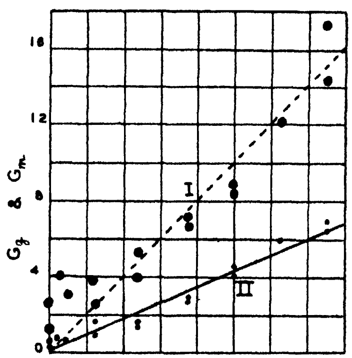


FIG. 3. — Gonflement des gels G_g (I) et des membranes G_m (II) en fonction du rapport gélifiant/nitrocellulose dans les solutions initiales correspondantes.

du solvant et de l'atmosphère, et sa teneur, 5-10 p. 100 du poids du gel, donne une idée de la quantité d'eau pouvant être fixée par les autres gels. Ces teneurs correspondent à moins de 1 p. 100 du poids des solutions initiales.

La figure 2 représente graphiquement les quantités (en pour 100 des solutions initiales) d'acétone et d'alcool propylique évaporées et restant dans les gels. Ces nombres ont été calculés à partir des valeurs de G_g, la quantité de nitrocellulose étant la même dans les deux cas.

b) *Le gonflement des gels et des membranes.*

La figure 3 montre que le rapport gélifiant/nitrocellulose dans les solutions initiales est pratiquement égal au gonfle-

ment des gels au moment de leur formation (droite I). La relation linéaire subsiste, mais à un autre niveau, pour les membranes lavées (droite II). On peut se rendre compte de l'importance de la contraction que subissent les gels lorsque les solvants sont remplacés par l'eau (durcissement des gels) en comparant les valeurs de G_g et G_m des mêmes membranes.

c) *Gonflement et porosité de membranes préparées par des méthodes différentes.*

Le gonflement des membranes présente un intérêt particulier dans l'étude de la perméabilité des membranes, puisqu'il donne une indication sur le volume occupé par les pores. Nous avons pu nous rendre compte que des membranes ayant un gonflement semblable, mais possédant des porosités différentes, se distinguent par les dimensions des agrégats de nitrocellulose dont elles sont constituées [**13**]. Si, par contre, on avait des membranes de porosités différentes formées par des agrégats de nitrocellulose de dimensions identiques, on peut prévoir que leur porosité dépendra de leur gonflement.

Supposons, comme nous l'avons déjà fait auparavant, que c'est au moment de la gélification du système que les dimensions des agrégats sont fixées. Une évaporation prolongée au delà de ce moment n'aura pour effet que de réduire le gonflement de la membrane, effet comparable à un « rétrécissement de mailles », et le diamètre de chaque interstice décroîtra proportionnellement à la diminution de la phase liquide Pour vérifier notre hypothèse nous nous sommes adressés aux résultats expérimentaux publiés par Pierce [**16**]. Cet auteur a préparé des membranes en partant d'une seule et même solution de nitrocellulose et ne faisait varier que le temps d'évaporation pour obtenir des membranes de porosités différentes. Nous avons pu nous rendre compte, en recalculant les données de Pierce de manière à les rendre comparables aux nôtres, que notre supposition se trouve vérifiée, puisque dans ce cas la porosité des membranes est une fonction simple du gonflement.

Si, par contre, on s'adresse aux résultats que nous avons obtenus avec des solutions acétoniques de composition variable,

ou à ceux d'Eggerth [3] se rapportant à des membranes préparées en faisant varier la composition d'un collodion à l'alcool-éther, il est facile de constater que la relation entre la porosité et le gonflement n'est pas simple. Dans ce cas ce sont donc les dimensions des agrégats de nitrocellulose qui varient.

Il nous paraît tout naturel d'admettre que les dimensions des agrégats de nitrocellulose dépendent de la teneur en solvant du système au moment de sa transformation en gel. En effet, la quantité de nitrocellulose dans ce dernier étant constante, l'état de dispersion de la nitrocellulose dépend de la proportion du solvant présent : plus il y a de solvant, plus les agrégats seront petits. Or, comme nous l'avons vu, la teneur du gel en solvant croît lorsque l'on augmente le rapport solvant/gélifiant de la solution initiale. Il s'ensuit que l'augmentation de ce rapport aura pour effet de donner des membranes constituées par des agrégats de nitrocellulose plus petits. Ce fait doit se traduire par une diminution de la porosité et l'expérience montre que c'est effectivement le cas.

En résumé, de tout ce qui a été dit dans ce chapitre, nous croyons pouvoir dégager les renseignements suivants :

La structure des membranes en nitrocellulose obtenues par évaporation dépend surtout de la composition du système au moment de la gélification, qui à son tour est fonction de la composition du liquide initial. Le rapport gélifiant/nitrocellulose dans la solution initiale conditionne le gonflement du gel et, partant, des membranes. Tandis que du rapport solvant/gélifiant dans la solution initiale dépend la teneur en solvant du gel au moment de sa formation, teneur qui, à son tour, conditionne les dimensions des agrégats de nitrocellulose.

Les différences dans les porosités de membranes obtenues par l'évaporation de solutions de composition différente ne peuvent s'expliquer uniquement par la variation du volume occupé par les pores. La porosité d'une membrane dépend de son gonflement et des dimensions des agrégats de nitrocellulose dont elle est composée.

Nous pensons que les conclusions auxquelles nous sommes arrivés en étudiant un nombre restreint de systèmes doivent être valables pour

d'autres systèmes où la substance solide est la nitrocellulose et, peut-être, même à d'autres cas qui fournissent des gels par évaporation.

On pourrait probablement obtenir des membranes de diverses porosités en cellulose par une technique dérivée de celle d'Ettisch et Hellriegel [7], en faisant varier les proportions d'ammoniaque, de sulfate de cuivre et d'eau dans la liqueur de Schweizer.

Dans nos expériences, la teneur en nitrocellulose a été maintenue constante ; une variation des dimensions des agrégats de nitrocellulose pourait être obtenue aussi en faisant varier la teneur en nitrocellulose, en employant, par exemple, 10 cent. cubes d'une solution à 4 p. 100 ou 20 cent. cubes d'une solution à 2 p. 100 de nitrocellulose dans le même mélange de solvants. Dans des systèmes autres que le collodion, et où la solubilité serait limitée à une faible marge de variation des rapports solvant/gélifiant, la modification de la proportion de la substance solide serait le meilleur moyen pour faire varier la porosité.

CHAPITRE II

Rôle des divers solvants organiques dans la préparation des membranes.

Dans le chapitre précédent, nous avons indiqué que non seulement la quantité de solvant présent dans le gel au moment de sa formation, mais aussi sa nature jouait un rôle important dans l'obtention de membranes de diverses porosités. Il suffit de comparer des membranes préparées avec des solutions dont seuls les solvants sont différents (par exemple éther et acétone): l'une sera transparente et peu poreuse, l'autre opaque et très poreuse.

Le stade suivant dans notre tentative de diminuer l'empirisme dans la préparation de membranes sera donc une classification des principaux solvants organiques usuels d'après leur action sur les propriétés des membranes (3). Nos expériences nous ont montré que l'on peut les diviser en cinq groupes plus ou moins nettement délimités.

(3) Divers auteurs [8, 10, 15] ont publié des données sur l'action de divers solvants ajoutés à un collodion à l'alcool-éther, mais, à notre connaissance, on n'a pas essayé d'établir une classification de solvants basée sur des mesures de membranes obtenues à partir de systèmes simples autres que le collodion à l'alcool-éther.

Ce sont :

A. Solvants de la nitrocellulose : 1° Solvants « parfaits » ; 2° solvants « gonflants ».

B. Non solvants de la nitrocellulose : 1° « Gélifiants »; 2° « précipitants imparfaits » ; 3° « précipitants parfaits ».

Cette division n'a, bien entendu, rien d'absolu, et il existe des corps ayant des propriétés intermédiaires.

A. — Solvants de la nitrocellulose.

La définition de ce groupe a été déjà donnée (p. 160). De nombreux solvants organiques dissolvent la nitrocellulose, mais l'exemple de l'acétone et de l'éther, cité ci-dessus, montre

Tableau V.

PROPRIÉTÉ	SOLVANTS PARFAITS	SOLVANTS GONFLANTS
1. Porosité des membranes (1).	Faible (2R < 100 mμ).	Forte (2R > 100 mμ).
2. Aspect d'un film obtenu par l'évaporation à l'air libre d'une solution de nitrocellulose dans le solvant seul.	Transparent.	Blanc, opaque.
3. Dissolution d'un petit tampon lâche de fibres de nitrocellulose dans le solvant pur.	Dissolution graduelle sans déformation préalable des fibres ; comportement comparable à un cristal de sel dans l'eau.	Le tampon est déformé et est transformé en une sorte de gel qui se dissout ensuite lentement ; comportement comparable à la gélatine dans l'eau chaude.
4. Comportement d'un petit tampon lâche, de fibres de nitrocellulose exposé à l'action des vapeurs du solvant à la température du laboratoire.	Pas de changements.	Gonflement des fibres, suivi de liquéfaction.

(1) En prenant, pour faire la comparaison, des solutions ayant la même teneur en nitrocellulose et en gélifiant (par exemple 30 p. 100 d'alcool propylique).

que certains solvants se distinguent des autres par la structure des membranes qu'ils conditionnent. Nous avons trouvé que l'on peut distinguer deux sortes de solvants, en basant cette distinction sur les quelques caractéristiques, résumées dans le tableau V, dans l'ordre décroissant de leur importance. Nous

avons dénommé le premier groupe de solvants « les solvants parfaits », puisque nous croyons que la nitrocellulose peut y être plus complètement dispersée que dans le deuxième groupe, que nous appelons « solvants gonflants » (cette dénomination étant choisie d'après leur caractéristique 3 du tableau V, ne veut pas dire que les liquides de ce groupe sont moins bons solvants de la nitrocellulose que ceux du premier groupe).

1° Solvants parfaits. — Du point de vue de leur usage, en pratique ces solvants peuvent être partagés en deux sous-groupes :

a) Ceux dont le point d'ébullition est inférieur à 80° peuvent être employés, dans la fabrication des membranes, comme solvants pour la préparation des solutions initiales de nitrocellulose, lorsque l'on utilise un gélifiant ayant un point d'ébullition plus élevé.

L'éther (en présence d'alcool) a été le solvant le plus courant; il est un des composants principaux du collodion ordinaire et des solutions employées dans la préparation des membranes Gradocol d'Elford. Mais son évaporation étant trop rapide nous évitons son emploi, pour les raisons indiquées plus haut (p. 162). L'alcool méthylique est trop toxique pour pouvoir être choisi comme solvant.

Tableau VI. — **Solvants parfaits**

	P. E. en degrés
Ether éthylique en présence d'alcool)	36
Formiate d'éthyle	54,4
Alcool méthylique	64,6
Acétate d'éthyle	77
Propionate de méthyle	79,9
Dioxane	101,5
Acide acétique	118
Ether monoéthylique du glycol	135
Acétate d'amyle	148
Cyclohexanone	156

Parmi les produits que nous avons essayés et qui figurent sur le tableau VI, il ne reste donc que le formiate et l'acétate d'éthyle. Ces deux solvants, utilisés avec des proportions

TABLEAU VII.

	NUMÉROS DES MEMBRANES							
	40 *a*	40 *b*	41	42 *a*	42 *b*	43	44	45
Composition des solutions initiales, en p. 100, en poids :								
Nitrocellulose	4		4	4		4	4	4
Alcool propylique	60		50	40		30	20	0
Acétate d'éthyle	36		46	56		66	76	96
Rapport $\frac{\text{Acétate d'éthyle}}{\text{Alcool propylique}}$.	0,6		0,9	1,4		2,2	3,8	
Rapport $\frac{\text{Alcool propylique}}{\text{Nitrocellulose}}$ . . .	15		12,5	10		7,5	5	
Humidité atmosphérique relative (Lambrecht)	68	57	65	72	67	65	55	59
Membranes :								
Epaisseur, en centimètres . . .	0,043	0,034	0,029	0,020	0,018	0,0035	0,005	0,004
Gonflement : G_m	9,7	8,2	6,2	4,6	3,1	0,55	0,4	0,2
2R, en mμ	67	54	45	37	27	6,5	2.0	Imperm.

variables d'alcool propylique comme gélifiant, nous ont donné des séries d'excellentes membranes dépourvues de « structures polygonales » Une série de membranes, obtenue avec de l'acétate d'éthyle, est reproduite dans le tableau VII

b) Les solvants parfaits moins volatils (P. E. supérieur à 80°), additionnés même en petite quantité, à des solutions contenant un solvant gonflant abaissent la porosité des membranes. Cet effet correspond à celui produit par une augmentation de la proportion en solvant d'une solution initiale ; les solvants de ce groupe restent entièrement dans le gel, puisque peu volatils, c'est pourquoi même une petite quantité de ces solvants a une action très prononcée. Nous avons obtenu de bons résultats en employant l'éther monoéthylique du glycol (v. tableau XIV) dont l'usage a été déjà préconisé [6, 10].

2° SOLVANTS GONFLANTS. — Parmi les liquides organiques que nous avons étudiés, la plupart de ceux que nous classons comme solvants parfaits ont des P. E. assez élevés, tandis que les solvants gonflants caractéristiques ont en général des P. E.

inférieurs à 56°, le P. E. de l'acétone (v. tableau VIII). Ils sont trop volatils pour donner des membranes homogènes dans les conditions que nous avons choisies.

TABLEAU VIII. — **Solvants gonflants.**

	P. E. en degrés
Acétaldéhyde	21
Formiate de méthyle	31,5
Méthylal	44
Acétone	56,1
Acétate de méthyle	57,1
Butanone	79,6

Les deux derniers solvants ont des propriétés qui les rapprochent des solvants parfaits.

Le représentant le plus caractéristique de ce groupe de solvants est l'acétone Son emploi pour la préparation de membranes a été étudié dans le premier chapitre (tableau III). L'acétate de méthyle (ainsi que la butanone) donne des membranes dont la porosité est inférieure à celle résultant de l'emploi de l'acétone (tableau IX). On obtient facilement des

TABLEAU IX.

	NUMEROS DES MEMBRANES				
	50	51	52	53	54
Composition des solutions initiales, en p. 100, en poids :					
Nitrocellulose	4	4	4	4	4
Alcool propylique	60	50	40	30	20
Acétate de méthyle	36	46	56	66	76
Rapport $\frac{\text{Acétate de méthyle}}{\text{Alcool propylique}}$	0,6	0,9	1,4	2,2	3,8
Rapport $\frac{\text{Alcool propylique}}{\text{Nitrocellulose}}$	15	12,5	10	7,5	5
Humidité atmosphérique relative (Lambrecht)	63	66	65	61	65
Membranes :					
Epaisseur, en centimètres	0,062	0,043	0,031	0,028	0,019
Gonflement : G_m	15,2	11,5	8,5	6,1	3,6
2R, en mμ	110	76,9	62,5	49,0	38,6

séries de bonnes membranes, mais il semble que les résultats sont moins bien reproductibles. Nous croyons que ce fait est dû à l'hydrolyse de l'acétate de méthyle soit pendant l'évaporation, soit pendant la conservation des solutions.

L'humidité de l'air semble avoir une action plus prononcée sur la porosité des membranes faites avec des solvants gonflants qu'avec des solvants parfaits. Il est possible que les différences entre les résultats obtenus avec ces deux groupes soient dues, au moins en partie, à leur plus ou moins grande facilité d'hydratation.

B. — Non solvants de la nitrocellulose.

1° Gélifiants (v. définition p. 160). — Parmi les liquides organiques usuels, et pour des nitrocelluloses moyennement nitrées, il n'y a que deux gélifiants : l'alcool éthylique (P. E. = 79°) et l'alcool propylique normal (P. E. = 97°2). L'alcool méthylique est un solvant, tandis que les autres alcools aliphatiques saturés, y compris l'alcool isopropylique, précipitent la nitrocellulose de ses solutions.

Nous n'avons pas observé de différences notables entre les effets produits par l'emploi de l'un ou de l'autre de ces deux alcools, en dehors de ceux dus à la différence de volatilité et ceux dus à la formation de mélanges azéotropes. Nous avons fait figurer dans le tableau X quelques exemples de membranes obtenues à partir de solutions ayant la même teneur en nitrocellulose et en solvant, le gélifiant étant tantôt l'alcool éthylique, tantôt l'alcool propylique (en quantité égale).

Nous préférons l'alcool propylique normal, puisqu'il peut être employé avec un nombre plus grand de solvants et, surtout, puisqu'il est moins volatil que l'alcool éthylique. De ce fait, le danger d'une évaporation excessive est diminué et le gonflement des membranes est plus constant.

2° Précipitants imparfaits. — Nous rangeons dans ce groupe les alcools aliphatiques supérieurs. Ajoutés en assez grande quantité à une solution concentrée de nitrocellulose, ils provoquent la formation d'un précipité léger qui paraît gonflé, comme une sorte de gel. Lorsqu'on ajoute ces alcools à des

TABLEAU X.

SOLVANT	GÉLIFIANT	TENEUR de la solution initiale en gélifiant (p. 100)	2R mμ	G_m	REMARQUES
Ether éthylique.	Alcool éthylique.	38	26	5,9	
	Alcool propylique		25	5,6	
Acétone	Alcool éthylique.	20	6,5	2,0	
	Alcool propylique.		46,3	1,5	
Acétone	Alcool éthylique.	40	—	—	Se contracte violemment dans l'eau.
	Alcool propylique.		1.520	4,1	Bonne membrane.
Acétate d'éthyle.	Alcool éthylique (1).	40	—	—	Se contracte violemment dans l'eau.
	Alcool propylique.		37	4,6	Bonne membrane.

(1) Forme un mélange azéotrope.

solutions de nitrocellulose contenant un solvant et un gélifiant, on obtient par évaporation des gels qui se contractent fortement dans l'eau. On aboutit ainsi à des membranes peu gonflées et très résistantes, mais elles sont probablement moins homogènes, puisque cette contraction est un processus rapide pouvant avoir des effets différents sur diverses parties de la membrane.

TABLEAU XI.

ALCOOLS	VOLUME suffisant pour provoquer la précipitation (v. texte) en cent. cubes	MEMBRANES		
		2R (en mμ)	G_m	Remarques
Ethylique. . .	—	31,4	7,3	Bonne membrane
Isopropylique.	8-10	11,6	2,6	Membrane assez dure.
Butylique. . .	15	6	0,8	Membrane très résistante; froissée par la contraction.
Isobutylique .	6	6	0,9	Membrane très résistante, froissée par la contraction,
Isoamylique .	6	2	0,5	Membrane très résistante; fortement froissée.

Le tableau XI résume quelques-unes de nos observations ; dans la première colonne, nous avons noté le volume de

l'alcool qu'il faut ajouter à 2 cent. cubes d'une solution acétonique concentrée de nitrocellulose pour obtenir un début de précipitation. Les solutions qui ont servi à préparer les membranes contenaient : 4 p. 100 de nitrocellulose, 76 p. 100 d'éther, 10 p. 100 d'alcool éthylique et 10 p. 100 de l'alcool étudié (en poids).

Ces essais nous permettent d'expliquer pourquoi Asheshov [1] et Elford [5] ont obtenu un accroissement de la résistance des membranes et une diminution de leur porosité par l'adjonction de petites quantités d'alcool amylique au collodion : ces effets sont dus, à notre avis, à une plus forte contraction des gels pendant leur durcissement dans l'eau. Nous ne possédons pas de données pour expliquer la forte contraction des gels contenant ces alcools supérieurs, mais il est probable qu'elle peut dépendre de la tension interfaciale eau/alcool employé ; la valeur de cette tension augmente et la solubilité de ces alcools dans l'eau diminue lorsque l'on monte dans la série homologue.

3° Précipitants parfaits. — Sous cette dénomination nous groupons les liquides organiques dans lesquels la nitrocellulose est complètement insoluble et dont l'addition, même en faible quantité, précipite cette substance de ses solutions sous forme de flocons lourds, peu gonflés.

Parmi ces liquides, ceux qui sont miscibles avec l'eau (tels que la glycérine, le glycol, etc.) augmentent la porosité des membranes lorsqu'on en ajoute de petites quantités à une solution de nitrocellulose. Mais une addition de quantités plus grandes peut provoquer la formation de précipités de nitrocellulose pendant l'évaporation de la solution et altérer l'homogénéité du gel. Cet effet est analogue à celui produit par l'addition d'eau. Nous croyons qu'il est préférable de ne pas utiliser ces produits dans la préparation de membranes afin d'éviter toute cause pouvant affecter leur homogénéité.

Les précipitants non miscibles à l'eau semblent ne pas présenter d'intérêt dans la préparation de membranes en nitrocellulose.

CHAPITRE III

Principes d'une nouvelle technique de préparation de membranes homogènes de porosité graduée.

Au début de ce travail, nous avons indiqué que les techniques de préparation de membranes de porosité graduée ont les inconvénients suivants : elles sont empiriques, assez compliquées et donnent des membranes qui ne sont pas suffisamment homogènes. Les notions que nous venons d'exposer nous ont permis d'obtenir des membranes plus homogènes et de les préparer d'une façon plus rationnelle.

Nous n'indiquerons ci-dessous que les principes nouveaux ou les modifications introduites dans la technique de préparation des membranes ; les autres parties de la technique sont celles employées précédemment [5, 10] : emploi de cellules en verre optiquement plan, chambre à évaporation, préparation de grandes membranes (de 40 centimètres de diamètre) dans lesquelles on découpe un lot de membranes plus petites (de 3 ou 4 centimètres de diamètre), lavage des membranes jusqu'à élimination des solvants (4) et stérilisation par tyndallisation.

1° Homogénéité des membranes.

On peut supprimer les « structures polygonales macroscopiques » qui sont dues aux tourbillons de Bénard et qui, à notre avis, conditionnent la dispersion dans la grandeur des diamètres des pores, en évitant l'emploi de solvants trop volatils, en choisissant des solutions de nitrocellulose de viscosité convenable et, surtout, en ralentissant l'évaporation par des moyens mécaniques [couvercle] (5). Nous obtenons de bons

(4) Remarquons, à ce sujet, que dans les systèmes que nous avons étudiés, les solvants employés sont presque tous très solubles dans l'eau, ce qui permet de raccourcir le temps de lavage des membranes.

(5) Il est nécessaire, également, de laisser la solution à évaporer s'étaler d'une manière uniforme dans la cellule à évaporation avant le début

résultats en ralentissant l'évaporation de manière à ce que la gélification ne se produise qu'après quinze ou vingt heures d'évaporation. On arrête cette dernière une fois que le gel est bien formé, en plongeant la cellule à évaporation avec le gel dans l'eau (selon la manière habituelle).

Il faut, par ailleurs, transformer le gel en membrane sans déformer la régularité de sa structure et, par conséquent, diminuer, dans la mesure du possible, la contraction du gel pendant son durcissement par l'eau. Comme nous l'avons montré, le gonflement de la membrane est bien inférieur à celui du gel (fig. 3) et cette contraction nous paraît inévitable, mais nous pensons qu'il est préférable de ne pas employer, dans la préparation des membranes, de liquides tels que l'alcool amylique, qui provoquent une forte contraction du gel

2° Composition des solutions de nitrocellulose

Nous croyons avoir démontré que les diverses porosités sont conditionnées par les dimensions des agrégats de nitrocellulose à l'intérieur des membranes et que ces dimensions dépendent de la nature du solvant employé, ainsi que de la quantité de ce solvant présente dans le système au moment de la gélification.

Il s'agit donc de choisir des systèmes aussi simples que possible pouvant donner des membranes de toutes les porosités allant depuis quelques millimicrons jusqu'à plusieurs microns. Les systèmes les plus simples possibles sont des systèmes ternaires ; nous en avons étudié un certain nombre, ils contiennent tous de la nitrocellulose, un gélifiant et un solvant. Pour les raisons déjà indiquées, nous avons utilisé l'alcool propylique comme gélifiant dans tous nos systèmes. Le solvant est donc l'unique composant variable. Le tableau XII indique

de l'évaporation. A cet effet, après avoir versé la solution dans la cellule, nous la laissons recouverte par une plaque en verre pendant au moins une heure.

Par ailleurs, il n'est peut être pas inutile d'insister sur l'importance qu'il y a à mettre la cellule à évaporation très soigneusement à niveau, car l'homogénéité du lot de membranes dépend surtout de l'uniformité de l'épaisseur de la grande membrane.

TABLEAU XII.

SOLVANTS	GÉLIFIANT	ORDRE DE GRANDEUR des porosités, en mμ
Acétate d'éthyle.	Alcool propylique	0 à 60.
Formiate d'éthyle. . . .	Alcool propylique.	0 à 100.
Acétate de méthyle . . .	Alcool propylique.	30 à 250.
Butanone.	Alcool propylique	100 à 1.000 (encore peu étudié).
Acétone.	Alcool propylique.	200 à 3.000.

l'ordre de grandeur des porosités susceptibles d'être obtenues avec les divers solvants étudiés.

3° VARIATION DES POROSITÉS.

En partant de ces systèmes ternaires simples, on peut obtenir, par diverses techniques, des membranes de porosité graduée. Nous avons étudié les trois procédés suivants :

a) VARIATION DU RAPPORT SOLVANT/GÉLIFIANT DANS LES SOLUTIONS DE NITROCELLULOSE. — Ce procédé est simple et permet d'obtenir des résultats assez constants. Les séries de membranes indiquées dans les tableaux III, VII et IX ont été obtenues de cette manière. Mais les variations de porosité, dans chaque série, vont de pair avec des différences dans le gonflement des membranes et donc dans leur épaisseur, à poids égal de nitrocellulose.

Comme il ressort du tableau III, on pourrait obtenir toute la gamme de porosités en utilisant le système à l'acétone. Mais les membranes ayant un faible gonflement sont moins convenables et nous conseillons d'employer, par exemple, le système à l'acétone pour faire des membranes très poreuses, le système à l'acétate de méthyle pour obtenir des porosités moyennes et celui à l'acétate d'éthyle (ou au formiate d'éthyle) pour préparer des membranes peu poreuses.

b) MÉLANGE DE DEUX SOLUTIONS-MÈRES. — Pour obtenir des membranes de diverses porosités ayant toutes un gonflement similaire, on peut procéder de la manière suivante. On prépare deux solutions-mères ayant la même teneur en nitrocellulose,

TABLEAU XIII.

SOLUTIONS p. 100	2R (en mμ)	G_m	REMARQUES
B seule . . .	22,8	4,5	
50 B + 50 A. .	31,6	5,0	
20 B + 80 A. .	54,5	5,3	La grande différence entre les porosités de ces deux membranes est due surtout à une forte différence dans l'humidité atmosphérique.
10 B + 90 A. .	682	4,4	
4 B + 96 A. .	729	4,7	

Solution A : nitrocellulose, 4 p. 100; alcool propylique, 30 p. 100; acétone, 66 p. 100.
Solution B : nitrocellulose, 4 p. 100, alcool propylique, 30 p. 100; formiate d'éthyle, 66 p. 100.

en gélifiant (alcool propylique) et en solvant, mais dont l'une contient un solvant parfait et l'autre un solvant gonflant. En mélangeant ces deux solutions dans des proportions différentes, on doit obtenir toutes les porosités intermédiaires. Pour cela, il faudrait trouver deux solvants de type opposé, mais ayant des tensions de vapeurs très voisines. Nous n'avons pas encore trouvé un système idéal de ce genre, mais des essais faits avec des solutions contenant l'une de l'acétone (A) et l'autre du formiate d'éthyle (B) nous ont donné des résultats encourageants (tableau XIII) Les solutions contenaient : 4 p. 100 de nitrocellulose, 30 p. 100 d'alcool propylique et 66 p. 100 de solvant.

c) ADDITION D'UN SOLVANT PEU VOLATIL. — On peut modifier la porosité d'une membrane en ajoutant à la solution initiale des petites quantités variables d'un solvant peu volatil et du type opposé par rapport au solvant de base du système ternaire initial. Comme nous l'avons déjà indiqué, on peut réaliser facilement de telles modifications en partant d'un système contenant un solvant gonflant, il suffit d'y ajouter un peu de solvant parfait de P. E. assez élevé (par exemple d'éther monoéthylique du glycol, tableau XIV) ; on obtient ainsi une diminution de la porosité.

L'inverse est plus difficile à obtenir en pratique, puisque nous ne possédons pas de solvant gonflant peu volatil. Nous avons pu néanmoins réaliser une expérience de ce genre en

ajoutant de faibles quantités d'acétone ou d'acétate de méthyle à une solution contenant de l'éther comme solvant parfait de base. Un système de ce genre ne présentant pas d'intérêt pratique (à cause de l'éther), cette expérience n'était faite que pour démontrer l'exactitude de notre manière de voir. Les résultats expérimentaux, résumés dans le tableau XIV, confirment nos prévisions.

TABLEAU XIV.

COMPOSITION des solutions initiales p. 100, en poids	SOLVANT AJOUTÉ p. 100, en poids	2 R en mμ	G_m
Nitrocellulose . . . . 4 Alcool propylique . . 40 Acétone 56	Sans adjonction.	3.350	4,6
La même	Ether monoéthylique du glycol : 3.	98	7,4
La même	Ether monoéthylique du glycol : 5.	68	7,5
Nitrocellulose . . . . 4 Alcool éthylique. . . 20 Ether éthylique 77 (ou 66).	Sans adjonction.	9,8	2,4
La même	Acétone : 10.	21,4	2,9
La même	Acétate de méthyle : 10.	121	3,6

Ce procédé présente un inconvénient d'ordre pratique : d'une manière générale, il suffit d'ajouter très peu de solvant peu volatil pour obtenir un effet considérable et il est difficile de produire des variations de faible intensité.

Notons que c'est sur ce procédé qu'est basée l'obtention de variations des porosités dans la préparation des membranes Gradocol d'Elford.

4° REPRODUCTIBILITÉ.

Pour arriver à reproduire une membrane d'une porosité définie, il faut opérer d'une manière absolument identique : même composition et âge de la solution, même pureté des produits et mêmes conditions d'évaporation. Ce dernier point présente des difficultés. Nous faisons les évaporations dans une chambre d'environ 20 mètres cubes dépourvue de courants d'air et maintenue à une température constante (22°5). Mais ces précautions ne sont pas suffisantes, il faudrait également

maintenir l'humidité à un niveau constant, ce qui nécessite une installation spéciale assez coûteuse. Nous nous limitons à contrôler l'humidité atmosphérique et nous ne fabriquons pas de membranes quand elle est trop élevée (6).

Si l'on ne cherche pas à obtenir de résultats reproductibles, mais si l'on veut simplement préparer des membranes de diverses porosités, on peut même se passer d'une chambre à température constante Il faut alors éviter des changements brusques de température, protéger la cellule à évaporation des courants d'air et la couvrir avec un couvercle bien adapté.

Résumé.

L'étude de la gélification des solutions de nitrocellulose dans un mélange de deux liquides et l'établissement d'une classification des divers liquides organiques usuels d'après l'action qu'ils exercent au cours de la préparation des membranes ultrafiltrantes, nous ont permis de formuler les conclusions suivantes :

1° La structure des membranes en nitrocellulose, obtenues par évaporation, dépend surtout de la composition du système au moment de la gélification.

2° Les différences dans les porosités de membranes obtenues par l'évaporation de solutions de composition différente sont supérieures à celles que l'on aurait pu expliquer par la seule variation du volume occupé par les pores.

La porosité d'une membrane dépend : *a*) de son « gonflement » (rapport liquide/solide) ; *b*) des dimensions des agrégats de nitrocellulose.

a) Le gonflement du gel est pratiquement égal au rapport gélifiant/nitrocellulose dans la solution initiale ; le gonflement de la membrane lavée est proportionnel au gonflement du gel.

b) Les dimensions des agrégats de nitrocellulose dépendent

(6) Il est en effet difficile d'obtenir de bonnes membranes (surtout de porosité élevée) lorsque l'humidité dépasse 60 (Lambrecht). On peut y remédier, dans une certaine mesure, en ajoutant à la solution initiale de très petites quantités (inférieures généralement à 1 p. 100) d'acide acétique ou trichloracétique

de la nature et de la proportion du solvant présent dans le système au moment de la gélification. Cette proportion est fonction du rapport solvant/gélifiant dans la solution initiale.

3° On peut préparer des membranes ultrafiltrantes en partant de systèmes ternaires : nitrocellulose, gélifiant et solvant, dont on peut ne faire varier que le solvant. L'alcool propylique a été choisi comme gélifiant pour tous les systèmes. L'emploi de l'acétone, de l'acétate d'éthyle et de l'acétate de méthyle en qualité de solvants permet de couvrir toute la gamme des porosités.

4° Les porosités intermédiaires peuvent être obtenues soit en faisant varier le rapport solvant/gélifiant des solutions initiales, soit en faisant des mélanges en proportions différentes de deux solutions-mères contenant des solvants des deux types opposés (solvants parfaits et solvants gonflants), soit en ajoutant un solvant parfait peu volatil à un système dont le solvant est un solvant gonflant.

5° Des membranes homogènes dépourvues de « structures polygonales macroscopiques » ont été obtenues en évitant l'emploi de solvants trop volatils et, surtout, en diminuant la vitesse de l'évaporation par des moyens mécaniques

Une partie des expériences a été faite à l'Institut de Chimie biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg Nous tenons à remercier le professeur M. Nicloux, directeur de cet Institut, de sa bienveillance à notre égard.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Asheshov (I. N.). *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1925, p. 362.
[2] Bénard, cité par G. Jander et J. Zakowski. Membranfilter, Cella- und Ultrafeinfilter, Leipsig, 1929.
[3] Eggerth (A. H.). *J. Biol. Chem.*, **48**, 1921, p. 203.
[4] Elford (W. J.). *Proc. Roy. Soc. B.*, **106**, 1930, p. 216.
[5] Elford (W. J.). *Journ. Path. Bacter.*, **34**, 1931, p. 505.
[6] Elford (W. J.), Grabar (P.) et Ferry (J. D.). *Brit. J. Exper. Path.*, **16**, 1935, p. 583.
[7] Ettisch (G.) et Hellriegel (E.). *Biochem. Ztschr.*, **248**, 1932, p. 65
[8] Ferry (J. D.). *Chem. Rev.*, **18**, 1936, p. 373.
[9] Fleury (P.) et Awad (Y.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, **8**, 1926, p. 550.
[10] Grabar (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, **17**, 1935, p. 965.

[11] Grabar (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, **17**, 1935, p. 1245.
[12] Grabar (P.). *Cold Spring Harbor Symposia on quant. Biol.*, **6**, 1938, p. 252.
[13] Grabar (P.) et de Loureiro (J. A.). *J. Chim. Phys.*, **33**, 1936, p. 815.
[14] Grabar (P.) et Nikitine (S.). *J. Chim. Phys.*, **33**, 1936, p. 721.
[15] Nowatke (W.). *Thèse de doctorat.* Université de Poznan, Pologne, 1935.
[16] Pierce (H. F.). *J. Biol. Chem.*, **75**, 1927, p. 795.

RÉACTIONS PULMONAIRES DANS L'ANAPHYLAXIE

par A. GARIPUY.

(Laboratoire d'anatomie pathologique
de la Faculté de Médecine de Toulouse. Professeur Jean TAPIE.)

Les lésions anatomiques observées à la suite du choc anaphylactique mortel ont fait l'objet de nombreux travaux ; tous les auteurs insistent sur les troubles vasomoteurs, en particulier sur les lésions du type congestif ou hémorragique consécutives au choc anaphylactique et traduisant un déséquilibre neuro-humoral profond. Si l'animal survit au choc, il est classique d'admettre que tout rentre dans l'ordre au point de vue morphologique et que les lésions sont essentiellement fugaces.

Certains auteurs ont cependant étudié les altérations anatomiques consécutives à des chocs anaphylactiques répétés, mais les conclusions auxquelles ils ont abouti sont souvent contradictoires. Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude en répétant les injections déchaînantes et en gardant les animaux en expérience pendant une période suffisante (quatre à sept mois suivant les cas). Nous pensions, en opérant ainsi, pouvoir mettre en évidence non tant les lésions plus ou moins fugaces du choc anaphylactique que les altérations plus permanentes des divers organes et tissus (en particulier du tissu mésenchymateux) témoins de l'existence de l'état anaphylactique.

Les résultats d'ensemble de ces recherches ont été consignés dans notre thèse ; nous n'en parlerons pas ici. Dans ce travail ne seront envisagées que les *lésions pulmonaires consécutives à des chocs anaphylactiques répétés* chez des animaux ayant été gardés en expérience pendant quatre à sept mois.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE SUIVIE. — Toutes les recherches ont été effectuées sur le lapin adulte ; l'antigène utilisé a été, dans tous les cas, le sérum de cheval (sérum antidiphtérique de l'Institut Pasteur). La sensibilisation des lapins a été pratiquée chez tous les animaux de la même manière : deux à quatre injections sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum, à quatre jours d'intervalle. Dix ou quinze jours après la dernière injection préparante, nous avons commencé les injections déchaînantes qui furent répétées jusqu'à dix reprises à des intervalles variant de dix à quinze jours.

A la suite de ce traitement, l'animal était sacrifié par saignée de un à huit jours après la dernière injection déchaînante. Après ligature de la trachée, la cage thoracique était ouverte et les poumons immergés en masse dans du formol à 15 p. 100 salé (la rétraction pulmonaire était ainsi évitée) ; recoupe au bout de vingt-quatre heures et complément de la fixation soit dans du formol salé, soit dans du bichromate-alcool (Morel-Dalous).

Les injections déchaînantes ont été effectuées par diverses voies, de manière à pouvoir juger des différentes réactions anatomiques suivant le lieu des réinjections. C'est ainsi que les voies intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale et intratrachéales ont été utilisées.

La dose moyenne de sérum inoculé à chaque injection déchaînante a été de 5 cent. cubes, sauf pour 2 lapins traités par voie veineuse chez lesquels la dose a été de 1 cent. cube seulement à chaque reprise.

I. Lésions observées à la suite d'injections déchaînantes intratrachéales répétées.

L'introduction endotrachéale de l'antigène réalise, au niveau du poumon, un véritable phénomène local d'anaphylaxie analogue à celui décrit pour la peau par Arthus.

Dans cet ordre de faits, Friedberger, puis Busson ont observé seulement de l'emphysème sans grande réaction inflammatoire. Schlecht et Schwencker ont obtenu chez le

cobaye sensibilisé, des phénomènes congestifs accompagnés d'éosinophilie. Opie, par des injections directement intrapulmonaires à travers la paroi thoracique, a déterminé un phénomène d'Arthus typique avec nécrose centrale entourée d'œdème et d'une infiltration leucocytaire. Fried a obtenu par réinjection intratrachéale d'antigène chez le lapin, des lésions comparables, d'après lui, à celles de la pneumonie humaine. La lésion évolue comme tout phénomène d'Arthus : œdème, exsudation abondante de granulocytes dès la troisième heure, prolifération des cellules alvéolaires, réactions vasculaires importantes, etc... Au quatrième jour, Fried a observé parfois une véritable lésion lobaire avec infiltrat à mononucléaires, vascularite intense, thrombose et infarctus. Après le quatrième jour les lésions diminuent d'intensité.

Comparant les lésions observées chez l'animal sensibilisé et chez l'animal non sensibilisé, Fried conclut que les lésions observées sont de même ordre mais que la réaction est plus violente, plus étendue, plus précoce et en même temps d'évolution plus prolongée chez l'animal sensibilisé antérieurement. Bisceglie a confirmé les conclusions de Fried ainsi que Carlinfanti et Scalfi.

Expériences personnelles.

Nous avons repris ces expériences, mais *en répétant autant que possible les injections intratrachéales* pour voir si la répétition des injections est susceptible de modifier les lésions constatées.

Les injections intratrachéales ont été pratiquées, dans tous les cas, par piqûre de la trachée immédiatement au-dessous du larynx et non par voie nasale comme l'a effectué Carlinfanti.

Lapin 26. — Lapin adulte de 3 kilogrammes. Sérum de cheval antidiphtérique. 4 injections préparantes de 5 cent. cubes chacune en douze jours. Dix jours plus tard, 4 injections intraveineuses de 1/4 de centimètre cube à douze jours d'intervalle environ. Du huitième jour après la dernière au cinquantième jour, 4 injections intratrachéales de 5 cent. cubes. Saignée totale vingt-quatre heures après la dernière injection. Durée totale de l'expérience : quatre mois.

Cliniquement nous avons pu constater dans les deux poumons quelques râles sous-crépitants assez gros après la dernière injection intratrachéale, avant la saignée.

Aspect macroscopique des poumons : à la surface des deux poumons se trouvent des placards congestifs ou hémorragiques larges de 1 à 2 centimètres en moyenne, grossièrement arrondis. Certains de ces placards sont uniquement superficiels, d'autres se prolongent vers le hile. A la coupe du poumon, d'ailleurs, il existe des zones arrondies, hémorragiques, en assez grand nombre. Quelques foyers d'atélectasie et d'emphysème.

Histologiquement les lésions sont complexes. Tout d'abord dans certaines régions, rares il est vrai, l'aspect pulmonaire est normal.

Dans les zones altérées, l'épithélium bronchique est intact, mais la lumière bronchique est parfois obstruée par une substance hyaline acidophile. Les faisceaux conjonctifs péribronchiques sont souvent le siège d'un léger gonflement et d'une infiltration leucocytaire. Il existe quelques nodules lymphoïdes péribronchiques constitués en totalité par des lymphocytes. Les artères sont en général d'un calibre normal, elles sont rarement le siège d'une thrombose hyaline fibrinoïde, la média est très rarement désorganisée par une infiltration leucocytaire abondante. Le tissu élastique est bien conservé.

Les veines présentent des altérations beaucoup plus graves, presque toutes sont le siège d'une thrombose hyaline fibrinoïde complète ou incomplète. Leurs parois sont assez fréquemment le siège d'une désorganisation à peu près totale, leurs vestiges sont envahis par de nombreux granulocytes et monocytes.

Les parois alvéolaires sont profondément remaniées, les capillaires sont méconnaissables. Le fort épaississement des septa est dû surtout à une abondante infiltration de globules blancs. Parmi ceux-ci, les leucocytes pseudo-éosinophiles prédominent, mais les histiocytes et les monocytes sont également extrêmement nombreux. Les mitoses sont fréquentes, les fibrocytes normaux rares. Le tissu élastique est complètement fragmenté.

Les cavités alvéolaires sont infiltrées de nombreux globules rouges et de macrophages contenant du pigment. Les polynucléaires prédominent cependant. Certaines cavités alvéolaires sont remplies d'une substance hyaline fibrinoïde analogue à celle que l'on retrouve dans quelques bronches, dans certaines artères et surtout dans les veines. Cette substance hyaline ne semble pas représenter les restes du sérum injecté puisqu'elle peut se retrouver aussi bien dans les bronches et dans les alvéoles que dans les vaisseaux ; elle semble être un produit fibrinoïde. Il ne s'agit pas de fibrine, car la réaction de Weigert est négative.

En résumé, le poumon de ce lapin présente, à la suite de 8 injections déchaînantes (4 intraveineuses de 1/4 de cent. cube et 4 intratrachéales de 3 cent. cubes chacune), l'animal ayant été sacrifié vingt-quatre heures après l'injection déchaînante, des lésions exsudatives et hémorragiques analogues à

celles que l'on rencontre dans tout phénomène d'Arthus. La réaction interstitielle particulièrement importante est due à la dernière réinjection et, d'autre part, aux séquelles des injections antérieures.

Lapin 44. — 2 kilogr. 400. Après sensibilisation par voie sous-cutanée par 3 injections de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique en neuf jours, reçoit 10 injections déchaînantes intratrachéales en cinq mois. Saignée totale neuf jours après la dernière injection intratrachéale. Durée totale de l'expérience : six mois environ.

Macroscopiquement, les poumons présentent quelques points hémorragiques dus probablement à la mort par saignée.

Histologiquement, les lésions constatées sont analogues à celles du



Fig 1. — **Lapin 47** : Lésion massive du lobe inférieur gauche ; lésions plus discrètes du lobe supérieur, succédant à 8 injections déchaînantes intratrachéales de 5 cent. cubes de sérum antidipthérique de l'Institut Pasteur.

lapin 26. Mais la réaction interstitielle mésenchymateuse apparaît plus intense encore (histiocytes, lymphocytes, fibrocytes) et les cellules géantes sont fréquentes. L'importance de ces réactions est due au nombre élevé d'injections déchaînantes intratrachéales (10 au lieu de 4).

Lapin 45. — 2 kilogr. 250. Sensibilisation identique à celle du lapin 44. Trois injections déchaînantes intratrachéales de 5 cent. cubes chacune en trois semaines. Mort en une minute de l'animal après la dernière injection déchaînante ; dyspnée intense avant la mort.

Macroscopiquement : poumons légèrement ouatés avec quelques zones emphysémateuses, congestion de la base droite. Sur la coupe sourd un exsudat rose pâle.

Histologiquement : emphysème diffus avec, à l'intérieur, de nombreux alvéoles, exsudat rosé par l'éosine ; congestion surtout au niveau des veines et des capillaires : ces lésions semblent être le témoin de la dernière injection qui a entraîné la mort. Mais il existe en plus des lésions interstitielles localisées à de nombreuses cloisons inter-

alvéolaires (réaction monocyto-histiocytaire, lymphocytes) ; elles représentent les vestiges des lésions provoquées par les injections déchaînantes antérieures.

Lapin 47. — 2 kilogr. 740. Sensibilisation par 3 injections sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum de cheval en neuf jours. Huit injections déchaînantes intratrachéales de 5 cent. cubes chacune en quatorze semaines. Mort spontanée trois jours après la dernière injection



Fig. 2. — **Lapin 47** : Poumon. Lobe supérieur gauche. Alvéolite œdémateuse et catarrhale.

déchaînante intratrachéale. L'auscultation a fait percevoir des râles sous-crépitants au niveau des deux poumons et des râles crépitants à la base gauche.

Macroscopiquement, le lobe inférieur gauche est hépatisé, de coloration rouge, recouvert de fausses membranes, plus dense que l'eau. A la coupe, zone interne marron et zone externe rouge violacé. Le lobe supérieur présente des taches rouge violacé, annulaires ou polycycliques, se prolongeant vers le hile. Le poumon droit est hépatisé dans la zone médiastinale et paravertébrale. Adhérences interlobaires.

Exsudat pleural rosé de quelques centimètres cubes, bilatéral.

Histologiquement les lésions sont complexes.

Le foyer d'hépatisation lobaire est composé de plages de nécrose fibrinoïde incomplète, limitées par des fibrocytes plus ou moins altérés. Au voisinage immédiat de ces foyers on rencontre des lésions tout à fait différentes. Les cellules alvéolaires sont hautes, cubiques, limitant un alvéole rétréci libre ou occupé par une masse finement granuleuse, éosinophile, contenant parfois des plasmodes mutinucléés. Hémorragies interalvéolaires fréquentes. Les réactions interstitielles sont intenses : infiltration de cellules rondes basophiles, de tailles diverses,



Fig. 3. — **Lapin 47** : Poumon. Lobe inférieur gauche.
Métaplasie cubique de l'endothélium alvéolaire. Réaction interstitielle intense.

histiocytes, quelques fibroblastes, quelques rares polynucléaires pseudo-éosinophiles ; œdème interstitiel fibrinoïde ; tissu élastique méconnaissable. Les capillaires septaux sont gorgés de sang, parfois éclatés, leur endothélium prolifère nettement. Les artères, les artérioles, les veines sont le siège d'altérations profondes : réactions endothéliales, sous-endothéliales et adventitielles, gonflement fibrinoïde de la média, infiltration des parois vasculaires par des cellules mononucléées de divers types. Tous les vaisseaux sont gorgés de sang, aucun n'est thrombosé. Les bronches enfin présentent parfois une infiltration de leurs tuniques par des mononucléaires. Leur muqueuse est normale. Leur lumière est souvent occupée par des cellules à poussière alté-

rées, contenant des débris pigmentaires, englobées dans une substance finement granuleuse, éosinophile.

Les lésions du sommet gauche et celles du poumon droit sont constituées par une alvéolite catarrhale et hémorragique avec œdème fibrinoïde. Les réactions interstitielles et vasculaires sont particulièrement intenses, analogues à celles des lapins précédents. Le tissu élastique est particulièrement touché. L'examen bactériologique n'a permis de déceler aucun germe, ni à l'examen direct ni par culture.

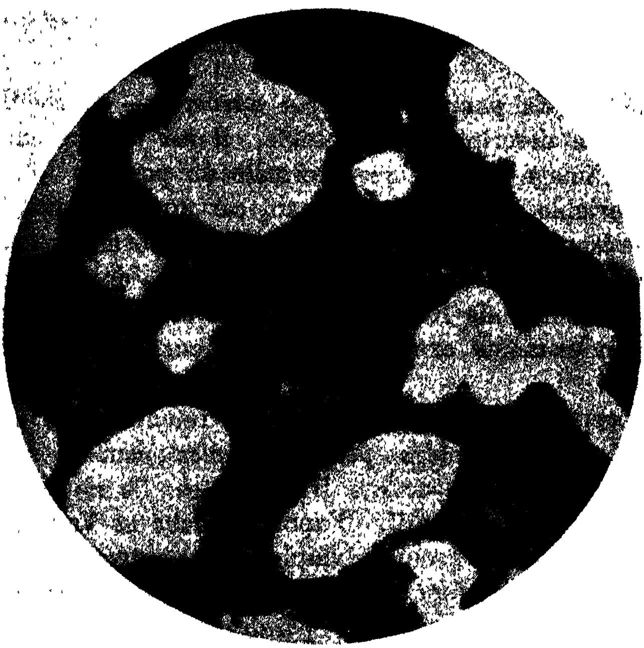


FIG. 4. — Lapin 44 : Poumon. Réaction interstitielle. Cellule géante.

En résumé, ce lapin ayant reçu 8 injections déchaînantes intratrachéales de 5 cent. cubes, est mort spontanément trois jours après la dernière injection des suites d'une lésion pulmonaire massive et étendue. Les lésions pulmonaires sont de trois ordres : nécrotiques, exsudatives et prolifératives. La nécrose fibrinoïde, analogue à celle que l'on retrouve dans tout phénomène d'Arthus intense, indique une sensibilité particulière de l'animal aux réinjections sériques. Les phénomènes prolifératifs représentent d'une part les lésions provo-

quées par la dernière injection et, d'autre part, les résidus des altérations provoquées par les injections intratrachéales antérieures. L'aspect de ces lésions interstitielles, la métaplasie cubique de l'épithélium pulmonaire et l'altération profonde du tissu élastique associés à des lésions vasculaires importantes permettent de penser à la possibilité d'une sclérose pulmonaire évolutive.

Considérations générales.

Structure du poumon du lapin normal. — Avant d'entamer toute description d'ensemble, il est indispensable de décrire l'image histologique normale du poumon du lapin, assez variable suivant les animaux, car un lapin, non traité, peut présenter des images pulmonaires, normales chez lui, qui pourraient induire en erreur. Lauche, dans le livre de Jaffé, Vaubel, puis Bisceglie ont traité cette question ; nous avons nous-même examiné les poumons de 3 lapins de contrôle.

Le premier point qui mérite d'être retenu est la présence de *nodules lymphoïdes péribronchiques* : ceux-ci sont uniquement constitués par des lymphocytes, ils ne renferment pas de centre germinatif. D'après Lauche et Vaubel, ainsi que Boissezon, ces groupes lymphoïdes se retrouveraient chez l'animal sain, alors que Pentimalli, au contraire, soutient que la présence des nodules parabronchiques ne peut être trouvée que chez des animaux traités par des injections d'albumine (quelle que soit la voie de l'injection). Bisceglie n'a pas retrouvé non plus d'amas lymphoïdes nodulaires, mais simplement quelques groupes de lymphocytes épars chez les animaux de contrôle. Nous n'avons nous-même rencontré, chez les animaux témoins, que quelques amas lymphoïdes sans nodules proprement dits ; par contre, nous avons constamment rencontré des nodules lymphoïdes parabronchiques dans les poumons des animaux en expérience, ne présentant pas de lésions pulmonaires trop graves. Quoi qu'il en soit, nous n'avons pas retenu la présence des nodules lymphoïdes comme signature d'un état pathologique, nous avons

simplement noté leur existence à chaque examen histologique.

L'atélectasie partielle ainsi que l'*emphysème* peuvent être rencontrés dans le poumon normal du lapin prélevé et fixé sans précautions. Par la ligature préalable de la trachée avant l'extraction des organes thoraciques et fixation en masse, il est facile d'éviter ces lésions.

L'épaisseur des parois alvéolaires constitue le dernier point sur lequel les discussions sont ouvertes : il semble certain que la paroi alvéolaire peut être épaissie par suite d'une augmentation de volume légère de l'endothélium pulmonaire, mais en général cette lésion découle de l'atélectasie. De plus, la paroi alvéolaire peut être le siège, chez le lapin normal, d'une très légère infiltration lymphocytaire et leucocytaire.

De ce bref exposé, il ressort que l'on ne doit pas retenir comme pathologiques des altérations minimes, comme celles dont nous venons de parler, car elles peuvent exister dans le poumon de lapins absolument sains. Nous n'avons tenu compte, dans nos expériences, que des altérations suffisamment importantes pour ne pas prêter à confusion.

Avant d'examiner les résultats obtenus par des injections intratrachéales déchaînantes répétées, nous indiquerons, pour établir un point de comparaison, les modifications pulmonaires observées à la suite d'une seule injection sérique intratrachéale chez l'animal sensibilisé ou non.

A la suite d'une injection intratrachéale chez l'animal non sensibilisé, Fried ainsi que Bisceglie ont constaté une réaction fugace durant de quarante-huit à soixante-douze heures, caractérisée par de l'alvéolite catarrhale légère accompagnée d'œdème, de congestion avec afflux de granulocytes atteignant son maximum en vingt-quatre heures.

Ces mêmes auteurs, à la suite d'une seule injection déchaînante intratrachéale chez l'animal sensibilisé notent de la congestion, de l'œdème accompagnés d'un afflux granulocytaire précoce vers la dixième heure. Les leucocytes sont rapidement détruits et la réaction histiocytaire devient prépondérante au bout de vingt-quatre heures. Dès cet instant, la réaction proliférative est intense ; elle s'accompagne d'importantes altérations vasculaires. Les cellules alvéolaires réagissent for-

tement et les septa sont épaissis par suite de la prolifération histiocytaire qui est très importante. Les vaisseaux sont profondément altérés, l'intima est bourgeonnante, l'adventice prolifère, la média est gonflée, épaissie. Au bout de quatre ou cinq jours, les lésions diminuent d'intensité et tous les phénomènes pathologiques disparaissent en huit à dix jours.

Au cours de nos expériences, nous avons constaté que la répétition des injections peut modifier l'aspect de la réaction anaphylactique.

Chez le lapin 45 qui est mort presque aussitôt après la 3e injection intratrachéale, nous retiendrons surtout les *lésions interstitielles*, résidus évidents des réactions provoquées par les injections antérieures pratiquées quinze jours et un mois avant la mort de l'animal. Les lésions exsudatives minimes (œdème, congestion vasculaire légère) représentent la réaction immédiate succédant à la réinjection intratrachéale ; elle nous intéresse peu actuellement. Mais les altérations interstitielles, quoique parcellaires, sont nettement pathologiques : la présence d'histiocytes, de cellules rondes basophiles et de fibrocytes indiquent une lésion en voie d'extinction, mais il semble difficile d'admettre que cette réaction ne laisse pas, après son passage, des signes légers de sclérose interstitielle.

Le lapin 26 qui avait reçu 4 injections déchaînantes intraveineuses et 4 intratrachéales, et qui fut sacrifié vingt-quatre heures après la dernière injection déchaînante, présente des lésions interstitielles beaucoup plus importantes que celles qui ont été décrites à la suite d'une seule injection déchaînante intratrachéale.

Chez le lapin 44 qui avait subi 10 injections déchaînantes intratrachéales et qui fut sacrifié neuf jours après la dernière injection, les réactions interstitielles sont intenses alors qu'à la suite d'une seule injection elles auraient entièrement disparu. On a trouvé des cellules géantes dans le tissu septal. Les éléments conjonctifs formant la majeure partie de la réaction interstitielle sont des éléments actifs, le Van Gieson ou le Masson ne permettent pas de constater une augmentation notable du tissu collagène. Cela n'a rien d'étonnant car la durée de l'expérience n'est pas encore assez longue et les

injections successives n'ont pas laissé le temps nécessaire pour l'organisation d'un tissu cicatriciel.

La métaplasie cubique des cellules alvéolaires constatée dans le poumon du lapin 47 complète encore la ressemblance des lésions avec celles que l'on peut retrouver dans certaines scléroses pulmonaires. Le lapin 47 présentait une sensibilité extrême aux réinjections sériques qu'attestaient, d'une part l'œdème très important accompagné de taches ecchymotiqus au niveau du phénomène d'Arthus de l'oreille et, d'autre part, les lésions pulmonaires accentuées avec altérations massives de tout le lobe inférieur gauche ayant entraîné la mort. Cette lésion massive traduit un processus aigu hyperergique, mais elle n'a aucun point commun avec le substratum anatomo-pathologique de la pneumonie franche aiguë de l'homme. Dans celle-ci, en effet, la lésion exsudative intense réalise une infiltration alvéolaire fibrino-leucocytaire.

Chez le lapin 47, les alvéoles sont fréquemment remplis par des macrophages, un œdème fibrinoïde en certains points, mais les leucocytes sont rares à ce stade et on ne constate nulle part la présence de fibrine. Ce qui domine le tableau anatomo-pathologique, c'est la réaction interstitielle intense associant l'œdème fibrinoïde, la multiplication des cellules conjonctives fixes et une congestion violente. Le tissu élastique est fragmenté, méconnaissable.

L'état des vaisseaux est tout à fait spécial, car les artères et les veines peuvent être le siège de modifications portant sur leurs trois tuniques : endothélite et multiplication avec gonflement des éléments sous-endothéliaux, gonflement ou dégénérescence de la média, œdème adventitiel avec prolifération cellulaire entraînant parfois de véritables manchons périvasculaires composés de cellules lymphocytoïdes de tailles variées et d'histiocytes. Leur tissu élastique est en général mieux conservé. Ces diverses modifications permettent de supposer que, si l'animal avait survécu, la possibilité d'une sclérose résiduelle ne doit pas être exclue.

Nous insisterons, pour terminer, sur deux points qui sont dignes de remarque : l'absence de réaction fibrineuse vraie et l'intégrité de la muqueuse bronchique.

Nous n'avons pu, à aucun moment, déceler la présence de filaments de fibrine au niveau des réactions provoquées par le traitement expérimental. Il est probable cependant que la fibrine doit pouvoir être découverte dans d'autres conditions expérimentales puisque Fried a constaté une exsudation fibrineuse abondante à la suite d'une seule injection déchaînante intratrachéale chez l'animal sensibilisé La répétition des injections a donc modifié aussi l'image histologique sur ce point : la fibrine est complètement absente au cours des réinjections multiples.

L'état des bronches est le dernier point que nous allons envisager, car il est curieux de constater l'intégrité quasi constante de leur muqueuse. Les altérations de la muqueuse bronchique sont en effet toujours secondaires à une infiltration leucocytaire ou monocytaire provenant soit du tissu cellulaire juxtabronchique, soit des éléments interstitiels voisins ; la muqueuse peut être ainsi, exceptionnellement d'ailleurs, envahie et même détruite. Les autres éléments constitutifs de la bronche sont lésés d'une manière plus intense. Dans les réactions fortes, le muscle, le cartilage, le tissu élastique et, bien entendu, l'adventice bronchique sont plus ou moins profondément altérés. Dans les réactions plus faibles au contraire, seuls les éléments conjonctifs péri-bronchiques réagissent comme les autres parties du tissu mésenchymateux par la formation d'éléments monocyto-hystiocytaires.

Les nodules lymphoïdes péribronchiques présentent, eux aussi, des signes évidents d'activité et leurs cellules constitutives se modifient et donnent naissance à de grands élément mononucléés comparables en tous points à des monocytes. Nous ne pouvons cependant affirmer ce phénomène avec certitude, car nous n'avons pas mis en évidence de termes de passage absolument convaincants.

En résumé, l'étude des phénomènes locaux d'anaphylaxie pulmonaire par réinjections répétées endotrachéales d'antigène montre que l'image histopathologique est nettement modifiée par la répétition même des injections déchaînantes. La durée de la réaction pathologique est fortement prolongée ;

nous ne pouvons préciser la durée exacte de la réaction, mais elle est d'au moins quinze jours d'après nos expériences ; les lésions anaphylactiques considérées comme fugaces par la plupart des auteurs sont au contraire persistantes lorsque les injections déchaînantes sont suffisamment répétées. Ce phénomène est particulièrement net au niveau du poumon où l'on arrive à obtenir, chez des animaux spécialement sensibles, des réactions intenses à prédominance interstitielle, mais n'épargnant aucun élément constitutif du poumon et rappelant même des lésions de sclérose pulmonaire active.

II. Lésions observées à la suite d'injections déchaînantes répétées par voies intraveineuse, sous-cutanée et intrapéritonéale.

Les réactions pulmonaires expérimentales qui vont être envisagées n'ont pas du tout la même signification que celles que nous venons d'étudier. Elles représentent, en effet, non la réponse locale à des réinjections *in situ* de l'antigène, mais les réactions à distance provoquées au niveau du poumon par des injections déchaînantes en divers points de l'organisme. Ces modifications pulmonaires ne sont qu'une partie des réactions plus générales que nous avons étudiées dans notre thèse.

A. — Altérations pulmonaires a la suite d'injections déchaînantes intraveineuses.

Les travaux de Auer et Lewis, Biedl et Kraus, Coca, Knepper et Waaler ont mis en évidence la contraction bronchique, le spasme artériel et la thrombose hyaline des vaisseaux pulmonaires à la suite d'un choc anaphylactique aigu. Ces lésions, pour intéressantes qu'elles soient, ne sauraient retenir longtemps notre attention car l'image histopathologique n'a pas eu le temps de se développer ; ce sont des réactions brutales, fonctionnelles, traduisant un déséquilibre neuro-humoral.

Lumière établit, en 1924, une distinction entre les lésions

constatées à la suite d'un choc mortel en quelques minutes et celles qui succèdent à un choc n'ayant entraîné l'issue fatale qu'au bout de plusieurs heures. Dans le premier cas, les lésions sont uniquement congestives, dans le second, au contraire, il existe une hépatisation et une atélectasie prononcées. Croizat confirme en 1927 les affirmations de Lumière et différencie, de plus, deux zones distinctes : une zone externe sous-pleurale avec énorme congestion capillaire et alvéolite desquamative, et une zone interne, voisine des pédicules bronchovasculaires, dans laquelle les lésions septales du type granulomateux prédominent : l'infiltration cellulaire est composée d'histiocytes, de macrophages, de lymphocytes, de polynucléaires rarement éosinophiles, enfin de cellules à type conjonctif parfois en mitose ou possédant un noyau géant. De plus, les sinusoïdes capillaires sont gorgés de sang et les hémorragies interstitielles y sont fréquentes.

Vaubel, en 1932, note chez les animaux traités par des injections de doses assez grandes d'albumine répétées à des intervalles de cinq à huit jours, une dilatation vasculaire avec épaississement des septa. Il n'a pu, dans aucun cas, constater de réactions lymphoïdes anormales. Carlinfanti et Scalfi ont récemment retrouvé des lésions analogues à celles décrites par Croizat et par Vaubel, en outre ils auraient constaté des infarctus véritables dus à la thrombose artérielle.

Expériences personnelles. — Nous avons examiné les poumons de 6 lapins ayant subi des chocs anaphylactiques par voie veineuse. L'un d'eux (lapin 42) est mort trois minutes après la première injection déchaînante. Les 5 autres ont subi 9 à 10 injections déchaînantes intraveineuses, soit de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique (lapins 38, 41 et 46), soit de 1 cent. cube (lapins 31 et 32). Ces 5 animaux ont été sacrifiés par saignée de un à huit jours après la dernière injection.

Lapin 42. — 2 kilogr. 300. Après sensibilisation par 3 injections sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum du 19 au 28 août, ce lapin reçoit, le 14 septembre, 5 cent. cubes de sérum par voie intraveineuse et meurt en trois minutes. A l'examen histologique on constate une constriction nette des artères et des bronches.

Lapin 38. — 1.900 grammes au début de l'expérience, 2 kilogr. 200 à la fin. Reçoit 3 injections préparantes sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique du 20 juin au 5 juillet. Le 14 août, injection déchaînante intraveineuse de 5 cent. cubes ; shock extrêmement grave dont l'animal se relève cependant. Du 14 août 1936 au 15 janvier 1937, l'animal reçoit 10 injections intraveineuses de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique à quinze jours d'intervalle environ. Chaque injection a été suivie d'un shock grave. Sacrifié par saignée le 23 janvier 1937, soit huit jours après la dernière injection déchaînante. Durée totale de l'expérience : sept mois.

A l'autopsie, après ligature de la trachée, le poumon droit présente une tache hémorragique superficielle de 2 millimètres de diamètre. Cette hémorragie est sûrement due au mode de sacrifice. Le poumon présente, en dehors de cette lésion, un aspect absolument normal.

Au point de vue histologique, les vaisseaux tout d'abord apparaissent fortement lésés. Les artères, de calibre sensiblement normal, sont parfois à moitié envahies par une thrombose hyaline fibrinoïde. Leur paroi est souvent désorganisée ; des fibrocytes, de grands mononucléaires l'envahissent ; l'endothélium bourgeonne, l'adventice est formé d'éléments conjonctifs jeunes. Les capillaires septaux sont congestionnés, bourrés de globules rouges, l'endothélium est en forte réaction. Les veines enfin présentent des altérations encore plus accentuées ; leur thrombose complète ou incomplète est très fréquente ; les cellules endothéliales bourgeonnent, la média est envahie par des éléments conjonctifs jeunes ainsi que l'adventice. Il est fréquent de rencontrer autour des pédicules broncho-vasculaires et quelle que soit la zone examinée (centrale ou périphérique), des formations nodulaires composées de globules rouges plus ou moins altérés et des éléments uniquement mononucléés dans lesquels on reconnaît des fibroblastes, quelques histiocytes et de grandes cellules à protoplasma basophile dérivant probablement des éléments conjonctifs fixes ; les lymphocytes sont rares. Les septa sont fortement épaissis ; cet épaississement provient non seulement de la congestion des capillaires, mais encore de la présence de nombreux fibrocytes et histiocytes septaux. L'endothélium des capillaires prend part aussi à l'hyperplasie. Le tissu élastique est très difficile à mettre en évidence, il est profondément altéré. Les cellules de l'endothélium pulmonaire sont augmentées de volume, leur épaisseur est nettement supérieure à la normale. Les cavités alvéolaires sont entièrement libres.

Les bronches sont normales dans l'ensemble ; il n'existe aucun follicule lymphoïde péribronchique, mais on retrouve fréquemment les nodules décrits plus haut composés de grandes cellules mononucléées.

En résumé, ce lapin, en expérience pendant sept mois, a reçu, après sensibilisation sous-cutanée, 10 injections déchaînantes intraveineuses de 5 cent. cubes avec un choc constant à chaque injection déchaînante. Les lésions pulmonaires sont très importantes. Elles sont interstitielles avec participation de tous les éléments conjonctifs et mésenchymateux. Il existe,

en particulier, une panvascularite intense, surtout marquée au niveau des veines. Le tissu élastique est profondément altéré. L'animal ayant été sacrifié huit jours après la dernière injection déchaînante, nous admettons que ces lésions persistent beaucoup plus longtemps qu'après une seule injection déchaînante et qu'elles représentent la somme des altérations provoquées par les injections déchaînantes intraveineuses successives.

LAPIN 41. — Ce lapin a reçu le même traitement que le précédent ; il a présenté des réactions analogues.

Les lésions pulmonaires sont à peu près identiques ; les artères sont cependant moins lésées. De plus, ce lapin a été sacrifié deux jours seulement après la dixième injection déchaînante ; on retrouve une légère infiltration alvéolaire composée de globules rouges et de macrophages ainsi qu'un œdème fibrinoïde des septa qui n'existait pas chez le lapin précédent (38), sacrifié huit jours après la dernière injection intraveineuse.

LAPIN 46. — Ce lapin a subi un traitement expérimental analogue à celui appliqué aux lapins 38 et 41. Les lésions vasculaires sont comparables à celles déjà décrites pour ces deux lapins, par contre, les lésions interstitielles des cloisons alvéolaires sont nulles.

LAPIN 31 et LAPIN 32. — Après sensibilisation par 4 injections sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique, les animaux ont reçu 10 injections intraveineuses déchaînantes de 1 cent. cube (au lieu de 5 cent. cubes pour les lapins 38, 41 et 46) du 18 novembre 1935 au 5 mai 1936. Sacrifiés par saignée le 6 mai 1936.

Les lésions pulmonaires constatées à l'examen histologique sont analogues à celles décrites pour les lapins 38 et 41.

B. — ÉTAT DU POUMON A LA SUITE D'INJECTIONS DÉCHAÎNANTES RÉPÉTÉES PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE.

LAPIN 48 et LAPIN 49. — Sensibilisation par 3 injections sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum de cheval du 20 août 1936 au 2 septembre 1936. 7 injections déchaînantes intrapéritonéales de 5 cent. cubes chacune du 12 septembre au 18 décembre 1936. Sacrifiés par saignée le 20 décembre 1936. Choc intense à chaque injection déchaînante.

L'examen histologique montre l'intégrité du poumon.

LAPIN 50. — Sensibilisation identique à celle des lapins 48 et 49.

Cinq injections déchaînantes intrapéritonéales de 5 cent. cubes du 25 septembre au 5 décembre 1936. Sacrifié par saignée le 9 décembre 1936. Choc variable à la suite de chaque injection déchaînante, tantôt marqué, tantôt cliniquement nul.

Lésions histologiques minimes : thrombose hyaline des veinules et de certains capillaires ; légère infiltration à mononucléaires des cloisons interalvéolaires. Ces lésions sont trop minimes pour qu'on puisse en affirmer la nature pathologique.

En somme, les 3 lapins traités par des injections intrapéritonéales répétées n'ont pas présenté de lésions pulmonaires nettes.

C. — Lésions pulmonaires à la suite d'injections déchaînantes répétées par la voie sous-cutanée.

Lapin 29. — Reçoit de juin 1936 à janvier 1937, 3 injections préparantes sous-cutanées de 5 cent. cubes de sérum antidiphtérique et 10 injections de 3 à 5 cent. cubes sous-cutanées à quinze jours d'intervalle. Chaque injection a été pratiquée en des points différents.

Les lésions constatées à l'examen histologique sont analogues à celles décrites pour le lapin 38 traité par la voie intraveineuse. Nous n'y reviendrons pas.

Lapins 36 et 37. — Ces deux lapins ont reçu un traitement expérimental analogue à celui subi par le lapin 29. Les poumons sont normaux à l'examen histologique.

Considérations générales.

L'étude anatomo-pathologique du poumon chez le lapin soumis à des injections déchaînantes répétées montre que cet organe réagit par des lésions d'une importance plus ou moins grande suivant le lieu des injections déchaînantes : la voie intraveineuse est celle qui s'accompagne le plus constamment de grosses altérations pulmonaires puisque 5 lapins sur 6 présentent de graves lésions. La voie péritonéale, par contre, ne convient pas, car sur les 3 lapins traités de cette manière, aucun ne présente de lésions nettes. La voie sous-cutanée enfin a permis d'obtenir une fois sur trois des lésions importantes.

Les études déjà publiées sur les lésions pulmonaires succédant à une seule injection déchaînante intraveineuse avaient montré l'existence de phénomènes exsudatifs puis prolifératifs avec vascularite. Mais ces altérations disparaissaient rapi-

dement et tout rentrait dans l'ordre en quelques jours.

La répétition des injections déchaînantes entraîne des altérations baucoup plus persistantes : sur un fond constitué avant tout par la réaction interstitielle viendront se greffer les phénomènes exsudatifs et prolifératifs qui succèdent à chaque injection déchaînante. C'est ainsi que les lapins 41, 31 et 32 sacrifiés un ou deux jours après la dernière injection déchaînante intraveineuse présentaient des phénomènes exsudatifs et prolifératifs. Chez le lapin 29 sacrifié trois jours après la dernière injection déchaînante sous-cutanée et chez le lapin 38, sacrifié huit jours après la dernière injection déchaînante intraveineuse, il n'existe plus que des phénomènes prolifératifs. Le fait que huit jours après une injection de grosses altérations persistent, montre bien que les injections déchaînantes répétées entraînent des lésions pulmonaires durables qui vont être maintenant schématisées.

Les *septa* sont très fortement épaissis du fait de divers facteurs : les capillaires sont rarement congestionnés, mais leur endothélium peut être en légère hyperplasie. Le nombre des cellules conjonctives en activité est très grand : monocytes, histiocytes et fibrocytes en abondance variable associés à un nombre plus ou moins grand de lymphocytes ; ce sont ces éléments qui contribuent le plus à l'épaississement des cloisons inter-alvéolaires. Le collagène adulte cependant ne semble pas augmenté. Ceci ne saurait surprendre, car les lapins avaient été soumis à des chocs successifs trop rapprochés pour permettre l'organisation d'un tissu conjonctif adulte. La présence de polynucléaires est exceptionnelle.

L'endothélium pulmonaire est souvent épaissi, mais nous n'avons pas rencontré de métaplasie cubique analogue à celle décrite chez le lapin 47 traité par des injections déchaînantes répétées intratrachéales. Les cavités alvéolaires sont libres de tout exsudat.

Les vaisseaux peuvent rester profondément altérés et les artères en particulier présentent parfois un épaississement net englobant l'intima et la média : dans cette zone, la coloration de Masson ou de Van Gieson fait parfois découvrir des fibrilles conjonctives adultes ; ce fait est rare cependant.

L'adventice réagit toujours, mais ces réactions sont d'intensité et de durée variables.

La thrombose hyaline des veinules se rencontre constamment, mais il ne faut pas oublier que la mort par saignée de l'animal peut entraîner cette lésion ; aussi est-il difficile d'en faire une altération nettement pathologique.

L'épithélium bronchique ne réagit pas, mais il peut être parfois envahi par des éléments monocyto-histiocytaires ; les nodules lymphoïdes péribronchiques présentent des signes d'activité.

Telles sont les lésions durables que l'on peut obtenir par des injections déchaînantes répétées par les voies intraveineuse, sous-cutanée et intrapéritonéale.

Leur interprétation est délicate mais semble pouvoir être trouvée dans le fait que l'antigène arrive dans les capillaires pulmonaires en quantité plus ou moins grande suivant la voie même des injections déchaînantes. Il est intéressant de remarquer, en effet, que les lésions pulmonaires observées sont importantes et fréquentes lors des réinjections intraveineuses (5 réactions importantes sur 6 lapins), alors qu'elles sont rares et peu intenses lors des réinoculations sous-cutanées de l'antigène (une réaction moyenne seulement sur 3 lapins), et pratiquement nulles lors de réinoculations intrapéritonéales (un cas douteux de réaction pathologique sur 3 lapins). Lors des injections intraveineuses, l'antigène arrive d'emblée et intact au niveau des capillaires pulmonaires ; ce fait peut expliquer la fréquence de l'intensité des réactions anatomiques constatées. Par des injections sous-cutanées, au contraire, l'antigène est plus ou moins localisé au lieu de l'injection par le phénomène d'Arthus ; cependant, chez certains animaux, le phénomène de localisation peut être imparfait et l'antigène est susceptible de pénétrer dans l'organisme soit par voie lymphatique, soit par voie veineuse pour arriver au niveau du poumon où son passage entraînera des réactions. De fait, le lapin 29 qui a présenté des réactions pulmonaires n'a réagi aux réinjections sous-cutanées répétées que par des phénomènes d'Arthus peu accentués aboutissant très rarement à la formation d'une escarre avec élimination.

Le lapin 36 et le lapin 37, traités de la même façon, ont réagi plus violemment et le lapin 37, en particulier, a présenté une escarre à chaque injection sous-cutanée ; le poumon n'a pas réagi chez ces deux lapins ; l'antigène, en effet, n'est pas entré dans la circulation veineuse (ou dans des proportions très minimes) du fait de l'intensité du phénomène d'Arthus ; il n'a donc pas entraîné de réaction pulmonaire.

Il en est de même pour les lapins traités par la voie péritonéale : aucun de ceux-ci n'a présenté de lésion pulmonaire car l'antigène était neutralisé par l'énorme masse mésenchymateuse constituée par le péritoine et l'épiploon.

Nous croyons donc logique d'interpréter les réactions pulmonaires comme étant dues à une action locale de l'antigène qui parvient au poumon par voie veineuse en quantité plus ou moins grande. Nous rapprocherons donc volontiers les lésions pulmonaires provoquées par la voie intratrachéale (donc avec apport de l'antigène *in situ*) de celles provoquées par les autres voies de réinoculations étudiées. Leurs images anatomiques sont d'ailleurs superposables ; seule l'intensité des réactions diffère. Dans tous les cas, les lésions évoluent en deux stades : exsudatif d'abord, prolifératif ensuite. Ce dernier stade est fugace lorsque l'injection déchaînante est unique ; au contraire, par la répétition des injections déchaînantes, il est possible d'obtenir des lésions beaucoup plus durables.

En dehors de cette interprétation (réaction locale d'arrêt et de neutralisation de l'antigène injecté), les réactions pulmonaires peuvent avoir une signification beaucoup plus générale; elles ne sont en effet qu'une partie des réactions qui intéressent tout le tissu mésenchymateux de l'organisme, comme nous avons pu le mettre en évidence dans notre thèse. Ces réactions pourraient alors être interprétées, ainsi que dans les états d'immunisation, comme étant le témoin ou la cause de la formation de substances jouant un rôle important dans les modifications humorales (formation d'anticorps en particulier) de l'organisme, sous l'influence d'antigènes divers.

Les études de nombreux auteurs, en particulier celles de Kuczinski, de Siegmund, de Domagk et d'Epstein dans

diverses infections microbiennes ont montré le rôle important du tissu mésenchymateux dans la lutte contre ces infections.

De Boissezon, dans son étude sur l'immunisation du lapin contre les globules rouges de mouton, a mis en évidence l'importance des réactions du système réticulo-endothélial, en particulier au niveau du poumon. Il existe, entre les résultats qu'il a obtenus et les nôtres, des différences de détail explicables par le fait que l'antigène employé était différent. De Boissezon conclut cependant, de son étude, que le poumon joue un rôle dans la sécrétion des anticorps. Il en est de même pour Pentimalli qui a étudié les réactions de divers organes (en particulier du poumon) au cours d'intoxications chroniques par diverses protéines. Les réactions qu'il a constatées sont identiques à celles que nous avons pu mettre nous-même en évidence à la suite de chocs anaphylactiques répétés.

Les lésions que nous avons décrites ne sont donc pas spécifiques de l'anaphylaxie ; elles semblent représenter un phénomène beaucoup plus général qui s'observe dans tout organisme modifié par l'introduction d'un antigène quelconque.

Les lésions pulmonaires constatées chez les lapins en expérience n'ont pas de rapport avec la violence et l'intensité du choc anaphylactique. En effet, parmi les animaux traités par voie intraveineuse, les lapins 32, 38, 41 et 46 ont présenté à chaque injection déchaînante, un choc important : les lésions pulmonaires étaient intenses chez les lapins 38 et 41 et minimes ou nulles chez les lapins 46 et 32. Le lapin 31, au contraire, traité par la même voie, ainsi que le lapin 29 traité par la voie sous-cutanée, n'ont pas présenté de signes cliniques de choc, mais les lésions pulmonaires constatées étaient importantes. Inversement, les lapins 48, 49 et 50 traités par la voie intrapéritonéale et ayant présenté un choc plus ou moins grave à la suite de chaque injection déchaînante ne présentaient aucune lésion pulmonaire. L'intensité du choc et le degré des lésions pulmonaires n'ont donc aucun rapport.

Conclusions.

L'étude des réactions pulmonaires chez le lapin dans l'anaphylaxie expérimentale provoquée par des injections

déchaînantes répétées jusqu'à dix reprises, ces injections déchaînantes ayant été faites par diverses voies (endotrachéale, intraveineuse, sous-cutanée et intrapéritonéale), montre que le poumon réagit dans de nombreux cas par des lésions persistantes, alors qu'un seul choc anaphylactique ne provoque que des réactions fugaces.

Les lésions persistantes ainsi provoquées sont d'ordre mésenchymateux (vascularite, mobilisation des éléments fixes du tissu conjonctif) ; elles sont analogues à celles qui ont été décrites dans les états d'immunisation ou dans les états d'intoxication protéidique.

Elles semblent représenter d'une part, une réaction locale de neutralisation de l'antigène injecté et, d'autre part, des réactions témoins de la formation de substances telles que les anticorps.

Ces réactions anatomiques, quoique n'ayant aucune spécificité au point de vue étiologique, peuvent justifier le terme souvent employé d' « inflammation anaphylactique ».

BIBLIOGRAPHIE

Auer et Lewis. *Journ. Exp. Med.*, 1910.
Biedl et Kraus. *Vortrag. d. freien Verein. f. Mikrob.*, 1909.
Bisceglie (V.). *Riv. di Patol. Sperim.*, mars-avril 1934,
Boissezon (P. de). *Journ. Phys. et Path. générales*, **33**, 1935.
Busson. *Wiener klin. Woch.*, **24**, 1911.
Carlinfanti et Scalfi. *Boll. Ist. Sier. Milanese*, **15**, 1936.
Coca. *Arch. f. Anat. und Path. Anat.*, 1909.
Croizat (P.). *Thèse Médecine*, Lyon, 1927. *Journ. Médec. de Lyon*, 1929.
Domagk. *Virchow's Archiv.*, **253**, 1924.
Epstein. *Virchow's Archiv.*, **273**, 1929.
Feuillié. *Revue de Médecine*, 1925. *C. R. Soc. de Biol.*, **49**, 1925.
Fried (J.). *Journ. Exp. Med.*, **57**, 1933.
Garipuy (A.) *Thèse Médecine*, Toulouse, 1937. E. Privat, éditeur.
Knepper et Waaler. *Virchow's Archiv.*, **296**, 1935.
Kuczinski. *Virchow's Archiv.*, **239**, 1922.
Lumière. *Le problème de l'Anaphylaxie*. O. Doin, Paris, 1924.
Opie (E. L.). *J. Imm.*, **9**, 1924.
Pentimalli. *Virchow's Archiv.*, **275**, 1930.
Schlecht et Schwencker. *Arch. für Exp. Path. und Pharm.*, **68**, 1912.
Siegmund. *Verhandl. d. deutsch. pathol. Gesellschaft*, 1923.
Vaubel. *Beit. z. Pathol. Anat. und Allg. Pathol.*, **89**, 1932.

Le Gérant : G. Masson.

Imprimé par l'Ancne Impie de la Cour d'Appel, A. Maretheux, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France).

T. 63 SEPTEMBRE 1939 N° 3

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

INFLUENCE DES ANTICOAGULANTS SUR LE DOSAGE DES ÉLÉMENTS DU SANG

par V. CHORINE.

(*Institut Pasteur. Service de M. le Professeur Marchoux.*)

PREMIÈRE PARTIE

Historique de la découverte des anticoagulants actuellement employés.

La découverte des anticoagulants a réalisé dans l'étude du sang, un progrès considérable, non seulement pour les recherches sur la coagulation, mais aussi pour l'étude des divers composants du sang et de leur répartition entre les globules et le plasma. Auparavant, la séparation du plasma était une manipulation délicate.

Delezenne, en 1896 [37], a fait ressortir l'influence du contact du sang avec les lèvres de la plaie sur la rapidité de la coagulation et il a vu que pour les vertébrés inférieurs, si l'on évite ce contact, on peut conserver très longtemps le sang incoagulé.

On sait aussi qu'on peut retarder la coagulation par l'action du froid, comme l'a montré déjà Hewson et ensuite Schmidt pour le sang de cheval [87 et 166].

Freund, en 1886 [55], a montré que l'utilisation de la verrerie vaselinée retarde sensiblement la coagulation du sang. Lilienfeld [116], en 1892, a eu l'idée de remplacer la vaseline par la paraffine, plus commode à manier. Bordet et Gengou, en 1902 [20], employèrent les tubes paraffinés pour la séparation du plasma.

Hammersten, en 1876 [76], a remarqué l'action favorisante du chlorure de calcium sur la coagulation. Green en 1888 [63], a émis l'hypothèse que les sels de calcium sont indispensables dans ce processus. Ringer et Sansbury [159] ont démontré que les sels de strontium et de baryum, métaux de la même famille que le calcium, peuvent, jusqu'à un certain point, remplacer les sels de ce dernier.

En 1890, Arthus et Pagès [2 et 3] avancent beaucoup la question en montrant que la précipitation du calcium par l'oxalate, le fluorure ou des savons de métaux alcalins, empêche la coagulation du sang.

Les premiers anticoagulants agissant *in vitro* à doses faibles étaient donc des sels qui précipitent le calcium ou en diminuent la dissociation ionique.

Lumière et Couturier, en 1926 [120], indiquent l'action anticoagulante puissante du sulfate de zinc.

On connaissait de longue date l'action anticoagulante des divers sels minéraux utilisés à forte dose, Hewson [87] l'établit en 1777.

On a vu ensuite que presque tous les sels neutres peuvent entraver la coagulation, mais l'action de ces substances n'est pas tout à fait comparable à celle des anticoagulants précités. En effet, les sels neutres exigent l'emploi de doses très fortes et leur action se résume, au moins pour certains, à la précipitation du fibrinogène, protéide plus facilement précipitable par les sels neutres que les autres fractions protéidiques du sérum. L'action des sels des métaux lourds est comparable à celle des sels neutres des métaux alcalins ou alcalino-terreux ; ils précipitent même les protéides à des concentrations plus faibles que ces derniers.

Parmi les anticoagulants organiques, il faut citer l'hirudine. C'est Haycraft [81] qui montra que la morsure de sangsue

suscite des hémorragies prolongées. Ce retard à la coagulation est dû à une substance soluble dans l'eau que cet auteur extrait à l'état impur. Bodang [18] a réussi à retirer des têtes de sangsues 78 milligrammes d'un corps appelé hirudine. Un milligramme de cette substance empêche la coagulation de 30 cent. cubes de sang de lapin.

Howell, en 1925 [86], a isolé du foie de chien l'héparine, très étudiée par Fischer et qui est un anticoagulant de plus en plus employé.

Enfin, le liquoïde qui est le polyanéthol-sulfonate de sodium, empêche la coagulation du sang. Il s'emploie fréquemment pour les recherches sur le plasma.

Plusieurs autres corps organiques possèdent la même activité, mais sont peu utilisés pour l'étude du sang. On peut citer : les mucates, les aconitates, les sulfosalycilates (A. Lumière), les dérivés sulfitiques des aminophénols (L. Launoy), la choline (Ed. Zunz et J. la Barre), le salvarsan, le moranyl qui est l'urée symétrique du métaminobenzoyl-métaminoparaméthylbenzoyl-1-naphtylamino 4-6-8 trisulfonate de sodium et son isomère.

L'utilisation des anticoagulants est très largement répandue dans les laboratoires pour les recherches les plus variées. Pendant longtemps on ne s'est pas occupé de l'action de ces substances sur le sang, en dehors de celle qu'on recherchait.

Cependant en 1894, Limbeck [117] a signalé que l'addition de sels au sang provoque un changement de volume globulaire. A la suite de quoi, nombreux ont été les travaux qui ont porté sur les variations du volume des globules rouges dans les milieux de tonicité différente. Les résultats ne sont pas toujours concordants. Les modifications du rapport du volume globulaire au volume plasmatique indiquent un changement dans la composition des globules rouges et du plasma, soit par échange d'eau, soit par échange d'autres corps. Il est évident que ces modifications doivent retentir sur les dosages des diverses substances chimiques, dosages que l'on pratique couramment sur les globules et le plasma.

Cette question, depuis quelques années attire de plus en plus l'attention des travailleurs et surtout des chimistes qui

se sont aperçus que la répartition de diverses substances entre le plasma et les globules est modifiée par l'emploi des anticoagulants.

Ce phénomène, dont les auteurs ne se sont pas suffisamment préoccupés, introduit des contradictions dans les analyses des constituants du sang et dans leur répartition entre globules et plasma.

Nous allons premièrement exposer les résultats de nos expériences et ensuite passer en revue quelques-uns des travaux récents dans lesquels nous avons relevé l'action perturbatrice des anticoagulants sur le dosage des divers constituants du sang.

Introduction.

Nous avons été amené aux recherches qui font l'objet de ce travail par l'examen des résultats surprenants que nous a donnés une de nos expériences. Nous dosions les protéides du plasma et du sérum d'un même animal, en l'occurrence le lapin. Le sang a été prélevé par ponction carotidienne et séparé en deux parties : l'une a été oxalatée à raison de 3 p. 1.000 ; nous avons laissé coaguler l'autre pour avoir le sérum. Le plasma séparé par centrifugation a été analysé après quinze minutes de contact avec l'anticoagulant. L'analyse du sérum conservé à la glacière en tube bouché a eu lieu vingt-quatre heures après la prise de sang. Le taux des protéides a été obtenu par dosage de l'azote protéidique sur 2 cent. cubes de liquide en utilisant la microméthode de Kjeldahl. Le coefficient de transformation de l'azote en protéides a été pris égal à 6,25. Voici les résultats :

	PROTEIDES du plasma oxalaté en grammes par litre	PROTEIDES du sérum en grammes par litre	DIFFÉRENCES au détriment du plasma en grammes
Lapin n° 1	57,10	59,20	— 2.10
Lapin n° 2	61,20	63,70	— 2.50
Lapin n° 3	53,90	59,10	— 5.20
Lapin n° 4	57,30	59,80	— 2,50
Lapin n° 5	71,50	73,50	— 2.00
Lapin n° 6	65,80	67,90	— 2,10

Ainsi donc, dans tous ces dosages, le plasma s'est montré plus pauvre en protéides que le sérum. D'après les prévisions théoriques, les résultats devaient être inverses, une partie des protéides du plasma ayant disparu du sérum avec la fibrine coagulée qui reste dans le caillot.

La fibrine que l'on trouve dans le plasma des mammifères à raison de 0,2 à 0,4 p. 100 contient, comme toutes les substances protéidiques, de l'azote et la teneur en est de 16,91 p. 100 [**133**].

Nous n'avons pas été les seuls à faire ces constatations. Gettler et Baker en 1916 [**59**], en comparant le taux de l'azote protéidique du plasma et du sérum d'un même sang ont remarqué que le plasma obtenu par centrifugation du sang oxalaté est plus pauvre en azote que le sérum.

Schmidt et Tuljtschinskaja en 1933 [**168**] ont fait les dosages d'azote total contenu dans le sérum et dans le plasma provenant d'un même sang. Le plasma a été obtenu par centrifugation du sang oxalaté à 10 p. 1.000. Toutes les analyses ont été pratiquées vingt-quatre heures après la prise de sang. Les sangs de l'homme, de chien, de mouton, de lapin et de cobaye ont été examinés avec des résultats sensiblement identiques. Le plasma s'est montré constamment plus pauvre, en moyenne de 6,26 p. 100 en azote protéidique que le sérum correspondant. Par fractionnement au sulfate d'ammonium, les auteurs ont précisé que la richesse du sérum en protéides est due à la plus forte teneur en albumine de celui-ci. Ils ne trouvent aucune explication à ce phénomène et suggèrent que la teneur plus forte du sérum en protéides est due à une formation d'albumine par le processus protéolytique et autolytique qui se produit au cours de la coagulation du sang (?).

D'autre part, Lehman et Scott [**111**], par dosages des protéides du plasma oxalaté, sans indication du taux d'oxalate, et du sérum des mêmes animaux : bœuf, chien, chat, ont trouvé que plasma et sérum contiennent sensiblement la même quantité de protéides. Pour expliquer cet excès relatif du sérum en protéides, ils admettent un passage réversible des protéides entre globules et plasma.

Nous avons pensé que l'anticoagulant utilisé dans ces expé-

riences était la source des erreurs commises ; pour nous en assurer, nous avons fait le dosage du plasma séparé par centrifugation rapide de sang, non additionné d'anticoagulant, et celui du sérum provenant du même sang. Les résultats ainsi obtenus sont très différents de ceux que nous avons rapportés plus haut.

	PROTÉIDES du plasma frais en grammes par litre	PROTÉIDES du sérum en grammes par litre	DIFFÉRENCES en faveur du plasma	
	—	—	en gr. par litre	en p. 100
Lapin n° 1 .	56,90	52,20	+ 4,70	9,0
Lapin n° 2 .	55,80	50,50	+ 5,30	10,5
Lapin n° 3 .	67,20	57,80	+ 9,40	16,3
Lapin n° 4 .	57,60	51,30	+ 6,30	12,4
Lapin n° 5 .	66,10	61,40	+ 4,70	7,7

N'ont été utilisés que le sérum et le plasma non teintés d'hémoglobine qui, en raison de sa richesse en azote, même en faible quantité, aurait faussé les résultats. Les chiffres ci-dessus indiquent que le plasma est en réalité plus riche en azote que le sérum ; les résultats inverses sont dus à l'emploi d'anticoagulants.

Les indications si différentes de ces deux séries d'expériences nous ont incité à en rechercher la cause.

Méthodes et matériel utilisés.

Nous avons commencé notre travail sur le sang du lapin et complété nos recherches sur celui de l'homme, du mouton et de la poule.

Pour nos premières expériences, nous opérions sur des animaux à jeun depuis vingt-quatre heures, mais nous nous sommes vite aperçu que cette précaution était inutile. Nos résultats restaient les mêmes, que l'animal ait mangé ou non, quelques heures avant la saignée.

PRISE DE SANG. — Elle a été pratiquée par ponction carotidienne chez le lapin et la poule. Pour ces opérations, nous avons suivi la technique de Borrel. Après incision cutanée sur la face antérieure du cou, on dénude la carotide et on la lie

le plus haut possible. On place deux autres fils pour ligatures ultérieures et on fixe sur l'artère une pince en amont de l'endroit qu'on veut ponctionner. Avec une pipette Pasteur dont l'extrémité effilée est chauffée au rouge, on carbonise légèrement la paroi artérielle sur une surface de 1 ou 2 millimètres carrés. En ce point, qui n'offre plus de résistance, on introduit la canule de Borrel préalablement paraffinée, avec son mandrin. On serre la ligature placée sur la canule pour éviter le suintement et on enlève la pince. Le mandrin est retiré et on rejette le premier jet de sang qui, ayant été en contact avec les lèvres de la plaie, se coagule plus rapidement. A la fin de la saignée on remet le mandrin, on lie l'artère, on retire la canule et on ferme la plaie.

La méthode de Borrel présente cet avantage que, grâce à la canule paraffinée, la coagulation du sang se trouve retardée. Quoique cette canule ait été conçue pour la saignée des poules, elle convient très bien aussi pour la ponction carotidienne du lapin, si on prend soin de la maintenir fixée par une ligature.

La prise de sang chez l'homme a été pratiquée par ponction veineuse avec une aiguille de Vernes. Nous avons fait chez le mouton la ponction de la veine jugulaire par la méthode habituelle.

Dosage des protéides. — Nous avons mesuré la quantité des protéides par le microdosage de l'azote protéidique par la méthode de Kjeldahl sur 1 cent. cube de sérum.

On sait que l'azote non protéidique du plasma, sauf quelques cas pathologiques, est en quantité très faible par rapport à l'azote protéidique ; plusieurs expérimentateurs négligent d'en tenir compte et l'erreur n'est guère appréciable. Cependant, nous avons, dans toutes nos expériences, éliminé l'azote non protéidique en précipitant les protéides par l'acide trichloracétique en opérant de la façon suivante. A 1 cent. cube de plasma ou de sérum mesuré avec une pipette à deux traits dans un tube à centrifugation en Pyrex de capacité de 40 cent. cubes, on ajoute 20 cent. cubes d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et on mélange bien. Après trente minutes de contact, on centrifuge. Le liquide surnageant est rejeté

et le culot de protéides redissous dans 1 ou 2 cent. cubes d'eau distillée additionnée de quelques gouttes de NaOH N. La solution des protéides est transportée dans une fiole à microdosage de Kjeldahl, le tube de centrifugation est rincé à sept ou huit reprises avec de l'eau distillée alcalinisée et les eaux de lavage sont réunies dans la même fiole.

Pour détruire la matière organique, nous avons additionné les protéides contenues dans 1 cent. cube de sérum ou de plasma ainsi traité, de 2 cent. cubes d'acide sulfurique pur et concentré. Pour élever la température d'ébullition, on ajoute dans chaque fiole 1 gramme de sulfate de potassium pur pour analyse et comme catalyseur 0 gr. 10 de sulfate de cuivre, proportion que G. Bertrand indique comme optima. On évapore l'eau doucement et on procède à la combustion de la matière organique.

On sait que quand on arrête le chauffage juste après la décoloration, on n'obtient pas le maximum d'azote dosable ; il faut chauffer toujours un peu plus. Cette prolongation du chauffage dépend non seulement de la substance à analyser, mais aussi du catalyseur employé. Nous avons suivi la recommandation de G. Bertrand [14] et recherché pour le sérum le temps de chauffage nécessaire après décoloration pour avoir le maximum d'azote dosable. Ordinairement ce temps ne dépasse pas soixante minutes après la décoloration. Voici les résultats d'une de nos expériences préliminaires sur 1 cent. cube de sérum de lapin.

TEMPS DE CHAUFFAGE après la décoloration —	AZOTE TROUVÉ dans 1 cent. cube en milligrammes —
0	10,39
30 minutes	10,78
60 minutes	10,85
1 heure 1/2	10,85
3 heures	10,85
6 heures	10,85
10 heures	10,78

On a donc le maximum d'azote au bout de soixante minutes. La prolongation du chauffage jusqu'à six heures n'altère pas les résultats.

On a proposé récemment le sélénium comme un catalyseur très actif permettant de diminuer le temps de destruction de la matière organique. Nous avons essayé ce catalyseur, qui est plus délicat à manier.

Dans l'expérience ci-dessous nous avons analysé 1 cent. cube de sérum de lapin en utilisant soit le sulfate de cuivre, soit l'anhydride sélénieux comme catalyseur. La décoloration est sensiblement plus rapide avec le sélénium ; elle est déjà complète dix minutes après l'attaque, tandis qu'avec le sulfate de cuivre, la même opération demande de vingt à trente minutes.

TEMPS DE CHAUFFAGE après la décoloration	AZOTE TROUVÉ dans 1 cent. cube de sérum en milligrammes quand on utilise comme catalyseur	
	le sélénium	le sulfate de cuivre
0	9,10	9,10
15 minutes	9,38	9,21
30 minutes	9,52	9,38
1 heure	9,52	9,52
2 heures	9,50	9,52
3 heures	9,21	9,52
5 heures	8,75	9,52
7 heures	8,18	9,48

On voit qu'avec le sélénium la quantité maximum d'azote dosable est plus rapidement atteinte, mais déjà après deux heures de chauffage, la quantité d'azote commence à diminuer. Avec le sulfate de cuivre la quantité maxima d'azote dosable est atteinte soixante minutes après la décoloration, mais elle reste constante pendant plusieurs heures. Le gain de temps que donne le sélénium n'est pas d'une réelle importance, mais l'emploi en exige une surveillance étroite pour obtenir des résultats corrects ; c'est pour cette raison que nous avons adopté le sulfate de cuivre. Nous avons remarqué aussi que quand on fait les dosages en double, le sélénium donne plus souvent de petites différences entre les deux échantillons, tandis qu'avec le sulfate de cuivre les résultats restent beaucoup plus stables.

Le dosage de l'ammoniaque a été fait dans l'appareil à distillation avec entraînement de vapeur d'eau, modifié par

de Saint-Rat. On a procédé au titrage de l'ammoniaque au fur et à mesure de la distillation, comme le conseille G. Bertrand, par l'emploi de la sonde N/10 et d'une burette graduée au vingtième de centimètre cube.

Le coefficient de 6,25 a été utilisé dans nos calculs pour transformer le poids d'azote en poids de protéides.

Tous nos dosages ont été faits en double. Pour toute différence dépassant 1 p. 100 nous avons répété le dosage.

Témoins. — Pour comparer l'action des anticoagulants, nous nous sommes servi de plasma recueilli dans des tubes *ad hoc* bien propres, et rapidement centrifugé à 5-6.000 tours-minute pendant cinq minutes. Pour préparer les tubes, après les avoir paraffinés et refroidis, on les plonge dans l'eau distillée pendant plusieurs heures pour éliminer les impuretés solubles dans l'eau qui pourraient se trouver incluses dans la paraffine et on les sèche avant usage à 37°. A la condition d'aller vite, on peut se servir de tubes même non paraffinés sans que les résultats changent.

Nous avons négligé l'influence du départ de CO_2 quand le sang était mis au contact de l'air. Hamburger [71] a montré que les variations de la concentration de ce gaz dans le sang influent sur le volume globulaire. Dans nos recherches, tous les échantillons de sang recueillis pour une même expérience ont été maintenus dans les mêmes conditions de température et de pression, de telle sorte que la perte en CO_2 était sensiblement identique dans tous nos prélèvements.

Verrerie utilisée. — Les tubes utilisés ainsi que les pipettes doivent être très propres. Pour cela, après les avoir lavés au mélange sulfo-chromique et à l'eau, il est nécessaire de les plonger dans l'eau distillée pendant plusieurs heures pour éliminer toute trace de substances solubles dans l'eau. Ensuite on les sèche à l'étuve. Il faut éviter d'employer la verrerie stérilisée au four Pasteur, car souvent elle en sort avec des traces plus ou moins marquées de produits empyreumatiques provenant de la distillation du papier, du coton, etc... Dans toutes les expériences où nous n'avons pas eu besoin de conserver le sang, nous avons utilisé de la verrerie

non stérilisée. Dans le cas contraire, nous avons stérilisé la verrerie soit à l'autoclave, soit même au four Pasteur, mais en veillant à la température pour que le coton en sorte à peine jaunâtre. Quand le temps nous le permettait, nous nous servions pour une même expérience de la même pipette lavée et séchée entre deux prises de plasma ou de sérum. La propreté des tubes joue un rôle des plus importants ; la moindre impureté soluble dans l'eau fausse les résultats.

ANTICOAGULANTS UTILISÉS. — Nous avons employé l'oxalate neutre de potassium pur pour analyses R. P. (Rhône-Poulenc), le fluorure de sodium neutre pur Poulenc, le citrate de soude purifié de la maison R. P. et les mêmes corps provenant de la maison Merck à l'état très pur, sans observer aucune modification dans les résultats obtenus avec les produits français.

L'héparine, le liquoïde et l'hirudine étaient fournis par la maison Hoffmann-La Roche.

Tous les anticoagulants utilisés sous forme de poudre provoquent une diminution du taux des protéides du plasma.

Dans cette série d'expériences faites sur le sang de lapin, les anticoagulants ont été ajoutés sous forme de poudre au sang, le mélange bien agité et le plasma obtenu par centrifugation après quinze minutes de contact.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
EXPÉRIENCE N° 1. — Lapin à jeun depuis 24 heures.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	67,60	
Plasma du sang citraté à 1 p 100	62,10	— 8,1
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	60,95	— 9,8
Plasma du sang fluoré à 1 p 100	57,20	— 15,4
EXPÉRIENCE N° 2.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	59,60	
Plasma du sang hirudiné à 0,05 p. 100	55,50	— 2,5

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
EXPÉRIENCE N° 3.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	61,10	
Plasma du sang hépariné à 0,015 p. 100	58,00	— 5,1
EXPÉRIENCE N° 4.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	70,40	
Plasma du sang liquoïdé à 0,15 p. 100	63,90	— 9,2

On voit que tous ces anticoagulants provoquent une diminution plus ou moins importante du taux des protéides du plasma du lapin.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
Sang humain prélevé à jeun.		
EXPÉRIENCE N° 5.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	80,10	
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	69,30	— 13,5
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	71,80	— 10,4
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	65,80	— 17,9
Plasma du sang hépariné à 0,015 p. 100	78,40	— 2,1
Sang de poule.		
EXPÉRIENCE N° 6.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	62,50	
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	51,90	— 17,0
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	53,20	— 14,9
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	55,30	— 11,5
Sang de mouton.		
EXPÉRIENCE N° 7.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	84,2	
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	74,7	— 11,3
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	76,5	— 9,1
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	79,2	— 5,9

Le sang de l'homme et ceux de la poule et du mouton se comportent, vis-à-vis de l'anticoagulant, comme le sang du lapin.

La diminution du taux des protéides est fonction de la quantité d'anticoagulant ajoutée.

Cette série d'expériences est faite sur le sang de lapin dont le plasma est séparé au bout de quinze minutes après le mélange avec l'anticoagulant.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
EXPÉRIENCE N° 8.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	57,10	
Plasma du sang oxalaté à 0,1 p. 100	56,10	— 1,8
Plasma du sang oxalaté à 0,3 p. 100	54,70	— 4,2
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	49,20	—13,8
EXPÉRIENCE N° 9.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Temoin	63,50	
Plasma du sang fluoré à 0,3 p. 100	58,20	— 8,3
Plasma du sang fluore à 0,5 p. 100	56,90	—10,4
Plasma du sang fluore à 1 p. 100	54,40	—14,3
EXPÉRIENCE N° 10.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	66,20	
Plasma du sang citraté à 0,4 p. 100	62,60	— 5,4
Plasma du sang citraté à 0,7 p. 100	60,10	— 9,2
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	59,60	—10,0
Sang de mouton.		
EXPÉRIENCE N° 11.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	84,2	
Plasma du sang fluoré à 0,5 p. 100	76,7	— 8,9
Plasma du sang fluore à 1 p 100	74,7	—11,3
EXPÉRIENCE N° 12.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Temoin	84,2	
Plasma du sang oxalate à 0,2 p. 100	81,2	— 3,6
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	79,8	— 5,2
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	76,5	— 9,1

On voit que la diminution du taux de protéides est proportionnelle à la quantité d'anticoagulants ajouté.

A des taux égaux d'anticoagulants, les sangs de différentes espèces et même d'une même espèce ne répondent pas identiquement.

En voici quelques exemples pour le sang de lapin :

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
EXPÉRIENCE N° 13 AVEC L'OXALATE DE POTASSE.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	58,10	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	50,90	— 12,4
EXPÉRIENCE N° 14.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	57,10	
Plasma oxalaté à 0,5 p 100	49,20	— 13,8
EXPÉRIENCE N° 15.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné Témoin	58,20	
Plasma oxalaté à 0,5 p. 100	52,50	— 9,8
EXPÉRIENCE N° 16.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	69,80	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	63,30	— 9,3
EXPÉRIENCE N° 17 AVEC LE CITRATE DE SOUDE.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	67,50	
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	62,10	— 8,0
EXPÉRIENCE N° 18.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	66,20	
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	59,60	— 10,0

Avec le fluorure de sodium, on observe aussi des variations individuelles.

Les anticoagulants agissent donc proportionnellement à l'augmentation de la concentration moléculaire. C'est pourquoi les anticoagulants puissants tels que l'héparine ou l'hirudine, agissant à des doses très faibles, donnent une diminution moins marquée que les autres. D'autre part, les variations individuelles que présente le sang de chaque animal, rendent impossible la prévision exacte de l'ordre de grandeur du phénomène. D'ailleurs Eisenman [44], en étudiant la répartition des électrolytes dans le sang oxalaté et défibriné, remarque que l'action de l'oxalate sur cette répartition varie avec chaque échantillon de sang.

Utilisation d'anticoagulants en solution.

Tout ce que nous avons vu jusqu'à présent s'applique aux anticoagulants en poudre. Les phénomènes restent les mêmes quand on utilise les solutions hypertoniques d'anticoagulants. L'avantage des solutions est de ne pas provoquer la lyse des globules rouges qu'on observe avec une intensité plus ou moins grande, autour des anticoagulants en poudre.

Si nous employons une solution hypertonique d'un coagulant quelconque, nous ajoutons au sang une quantité de liquide qui ne nous permet plus une comparaison avec un sang additionné d'anticoagulant en poudre. Il nous faut donc, pour obtenir des résultats comparatifs, user de témoins additionnés du même anticoagulant en solution sensiblement isotonique.

	PROTÉIDES en grammes par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
EXPÉRIENCE N° 19.		
10 cent. cubes de sang + 2 cent. cubes d'oxalate isotonique à 2,35 p. 100	51,20	
10 cent. cubes de sang + 2 cent. cubes d'oxalate à 10 p. 100	40,50	— 21,9

Des résultats analogues ont été observés avec le fluorure

et le citrate. Nous ne parlerons pas ici des solutions hypotoniques qui sont étudiées plus loin.

Des résultats plus intéressants sont à noter avec l'héparine. Nous avons vu qu'utilisée en poudre à dose active, elle ne donne que de faibles diminutions. En solution dans l'eau de 0,5 à 2,5 p. 100, il suffit d'en employer 0 c. c. 05 à 0 c. c. 2 pour 10 cent. cubes de sang pour éviter la coagulation. Les quantités de liquide ainsi ajoutées sont négligeables par rapport au volume du sang. Les nombreux dosages que nous avons pratiqués sur le plasma de sang de lapin ainsi hépariné nous ont donné des résultats exactement égaux à ceux qui ont été obtenus sur le plasma recueilli en tube paraffiné. Nous possédons donc, avec l'héparine utilisée en solution, un anticoagulant qui ne modifie pas pratiquement la concentration des protéides.

La diminution du taux des protéides ne se manifeste qu'en présence des globules rouges, sauf pour le liquoïde.

Nous avons cru tout d'abord que l'addition d'anticoagulants au sang amenait une précipitation des protéides plasmatiques et que l'addition d'un anticoagulant à un plasma clair mettrait en évidence. A cet effet, nous avons préparé l'expérience suivante.

Du sang de lapin est divisé en deux parties : l'une est recueillie dans un tube paraffiné et centrifugé immédiatement pour avoir le plasma frais, l'autre est recueillie dans un vase sur l'anticoagulant étudié. Le plasma frais, séparé des globules, est alors additionné du même anticoagulant à dose double de celle du sang total, de façon à compenser largement le volume globulaire qui dépasse rarement 40 p. 100 du sang total. Après la dissolution de l'anticoagulant, le plasma et le sang sont centrifugés.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
	—	—
Expérience n° 20.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	63,50	
Plasma du sang fluoré à 0,5 p. 100	56,90	— 10,4
Plasma fluoré à 1 p. 100 après séparation	63,80	+ 0,5
Expérience n° 21.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	66,20	
Plasma du sang citraté à 0,7 p. 100	60,10	— 9,2
Plasma citraté à 1 p. 100 après séparation	66,10	— 0,15
Expérience n° 22.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	57,00	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	52,70	— 7,5
Plasma oxalaté à 1 p. 100 après séparation	57,30	+ 0,5

De même avec l'héparine, on ne provoque pas de variations du taux des protéides dépassant l'erreur d'expérience quand elle est ajoutée au plasma séparé des globules rouges.

Ainsi le plasma séparé des globules rouges ne perd pas de protéides par addition d'un anticoagulant. Mais il en est tout autrement quand, à ce plasma, on restitue les globules rouges qu'on en avait séparés. Dans ce cas, il se comporte comme le sang total.

Expérience n° 23. — On prélève, par ponction carotidienne, du sang de lapin. A 10 cent. cubes, on ajoute 0 gr 05, soit 1/2 p. 100, d'oxalate de K en poudre. Le reste est recueilli dans un tube paraffiné et centrifugé rapidement. Le plasma séparé est oxalaté à 1 p. 100 pour compenser le volume des globules. On élimine le précipité d'oxalate de Ca par centrifugation et on en prélève 2 cent. cubes de plasma pour analyse. Il reste 7 cent. cubes qu'on remet sur les globules rouges provenant de la centrifugation des 20 cent. cubes de sang recueillis. On mélange bien et on laisse quinze minutes en contact. Après ce temps on sépare à nouveau le plasma par centrifugation ; voici les résultats :

	Protéides en grammes par litre	Variations du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	56,90	
Plasma oxalaté à 1 p. 100 après séparation des globules rouges et centrifugé	57,00	+ 0,18
Même plasma après passage sur les globules rouges	48.30	— 15,1

Expérience n° 24.

Avec le fluorure de Na nous avons :

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	57,90	
Plasma fluoré à 10,8 p. 100 après séparation et centrifugé	57,90	0
Même plasma après passage sur les globules.	51,50	— 11,1

Sauf pour l'oxalate de potassium, on ne remarque aucun trouble appréciable dans le plasma après addition des anticoagulants précités. Utilisé jusqu'à la dose de 1 p. 100, l'oxalate ne détermine que la précipitation du Ca. A des doses plus fortes, il précipite aussi une partie des protéides.

Seul le liquoïde (Polyanéthol sulfonate de Na), à des doses qui sont à la limite de son activité anticoagulante, provoque un abondant précipité dans lequel est contenue une partie des protéides, comme l'indique l'expérience suivante :

Expérience n° 25.

	Protéides en grammes par litre	Variations du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné. Témoin	70,50	
Plasma liquoïde à 0,25 p. 100 après séparation du précipité	69,20	— 1,8

Ainsi, sauf pour le liquoïde, il faut la présence des globules rouges pour amener une diminution des protéides. Ajoutons que, même pour le liquoïde, la diminution est beau-

coup plus grande quand il est additionné au sang total. Si nous avons vérifié qu'il ne se produit pas de précipitation des protéides dans le plasma, rien ne nous prouve que cette précipitation ne se produit pas dans le sang total.

On peut remplacer les globules rouges par des levures.

Quand nous parlons ici de globules rouges, nous faisons abstraction des globules blancs du sang qui interviennent sans doute dans le phénomène, mais qui sont en quantité négligeable. Reste à savoir s'il s'agit d'une question de masse ou d'une qualité spécifique. A cet effet, à du plasma nous ajoutons, par exemple, des levures préalablemnt lavées à plusieurs reprises.

Expérience n° 26 — On centrifuge du sang de lapin dans un tube paraffiné. Une partie du plasma séparé est additionnée de fluorure de sodium à raison de 10 p. 1.000, l'autre d'héparine en solution à 0,75 p. 100 à raison de 150 milligrammes-litre. Une partie de chacun de ces plasmas est remise sur un volumineux culot de levure lavée préalablement à 4 reprises dans l'eau physiologique. La dernière eau de lavage contient 0 gr. 14 d'azote par litre.

	Protéides en grammes par litre	Variations du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
Plasma témoin, recueilli en tube paraffiné	70,9	
Plasma fluoré après séparation des globules	70,6	— 0, 4
Plasma hépariné après separation des globules	70,8	— 0,14
Plasma fluoré remis sur les levures	67,0	— 5,1
Plasma hépariné remis sur les levures	70,3	— 0,8

Ainsi donc, la levure joue le même rôle, un peu plus faible, que les globules dans la diminution des protéides.

On peut remplacer le plasma par le sérum.

Si, au lieu du plasma, on étudie dans les mêmes conditions le sérum, on observe exactement le même phénomène.

Expérience n° 27. — On prend 10 cent. cubes de sérum de lapin qu'on additionne de fluorure de sodium à raison de 10 p. 1.000. On

remet ce sérum fluoré sur le culot de centrifugation de 10 cent. cubes de sang de lapin frais, dont le plasma contient 72 gr. 5 de protéides par litre.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
	—	—
Sérum fluoré à 10 p. 1.000	77,40	
Même sérum après le contact avec les globules rouges	66,30	— 14,4

Le plasma ne possède donc aucune propriété spéciale, puisque le sérum réagit de la même façon.

La diminution du taux des protéides n'est pas due à une précipitation de ceux-ci par les anticoagulants.

Examinons maintenant s'il se produit une précipitation dans le sang total. On pourrait penser que par leur charge électrique, les globules rouges pourraient provoquer une précipitation des protéides amenés à un état de déséquilibre par addition de substances étrangères.

On sait que les sels provoquent électivement la précipitation d'une des fractions protéidiques du sérum ou du plasma, le plus souvent une partie ou la totalité des fractions globuliniques. Le sulfate d'ammonium à demi-saturation, le sulfate de sodium à 22,2 p. 100 et le sulfate de magnésium à saturation précipitent la totalité des globulines ; le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, le sulfate de sodium à 14 p. 100 précipitent des fractions différentes, mais cependant dénommées toutes deux euglobulines, etc...

Si réellement la diminution des protéides que nous observons provenait d'une précipitation de ceux-ci par les anticoagulants ajoutés, le rapport globulines/albumines se trouverait affecté dans le plasma du sang traité et ne correspondrait plus au chiffre donné par le plasma témoin. Remarquons, en outre, que la quantité de substances mises en jeu dans nos expériences est de beaucoup inférieure à celle qui provoque un début de précipitation.

Nous séparons les globulines par le sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation. Nous les purifions par redissolution dans l'eau distillée et reprécipitation par le sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation ; nous les redissolvons de nouveau dans l'eau distillée et les reprécipitons par l'acide trichloracétique en concentration finale de 10 p. 100. Nous précipitons les albumines des eaux-mères par l'acide trichloracétique en concentration finale de 10 p. 100. Nous les centrifugeons, les dissolvons dans l'eau distillée additionnée d'une quantité de soude juste suffisante. Ensuite, les deux fractions ainsi obtenues sont lavées par centrifugation, à quatre reprises, dans l'acide trichloracétique à 10 p. 100, pour éliminer toute trace de sulfate d'ammonium. On pratique ensuite les dosages d'azote.

	PROTÉIDES totaux par litre	GLOBULINES par litre	ALBUMINE par litre	RAPPORT G/A
EXPÉRIENCE N° 28.				
Plasma témoin	63,62	17,62	46,20	0,381
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100.	44,39	12,28	32,11	0,382
EXPÉRIENCE N° 29.				
Plasma témoin	58,99	19,62	39,37	0,498
Plasma du sang à 0,5 p. 100 de CO^3Na^2 (1)	50,30	13,26	27,04	0,490

On voit donc que la diminution affecte proportionnellement les deux fractions protéidiques du plasma. Il est difficile de concevoir qu'il s'agisse ici d'une précipitation des protéides. Tout se passe comme si le plasma était dilué. Etant donné que le phénomène ne s'observe que dans le sang total, si notre hypothèse est exacte, l'eau qui dilue le plasma ne peut provenir que des globules rouges. Nous n'avons pas utilisé les autres anticoagulants, tels que l'héparine, car on sait que la présence de cette dernière suffit à inverser le rapport G/A par déplacement du point isoélectrique des protéides, comme les travaux de Fisher l'ont démontré.

(1) Nous avons utilisé, en ce cas, CO^3Na^2 qui se montre anticoagulant à hautes doses.

Les autres constituants du plasma accusent aussi une diminution par addition d'anticoagulants au sang.

Nous nous sommes adressé aux corps qui sont en quantité assez importante dans le sang, tels que le glucose, pour lesquels on possède des méthodes de dosage précises et commodes Il est à remarquer que ces corps se trouvent a un taux très faible dans le sang par rapport aux protéides et la différence observable est presque à la limite de l'erreur d'expérience, surtout quand l'anticoagulant est ajouté à doses faibles. Aussi nous nous sommes adressé à l'anticoagulant qui donne les différences les plus marquées, le fluorure de sodium à la concentration de 1 p. 100. Le glucose a été dosé par la méthode de G. Bertrand, adaptée pour les microdosages par de Saint-Rat et Ronfaut [164].

	PLASMA FLUORÉ A 1 P. 100 en grammes par litre		VARIATIONS en p. 100
	Après séparation des globules rouges	Avant séparation des globules rouges	
	—	—	—
EXPÉRIENCE N° 30.			
Protéides	68,90	58,90	— 14.5
Glucose	1,73	1,45	— 16.1
Protéides	68,70	57.20	— 16,7
Glucose.	1,06	0,87	— 17,9
Protéides . . .	72,70	60,50	— 16,8
Glucose . . .	2,77	2,33	— 15,8

Les résultats de Fontès et Thivolle [52] qui ne trouvent pas de différence dans le taux de glucides plasmatiques dosés, d'une part sur le plasma du sang fluoré et, d'autre part, sur le plasma du sang non additionné d'anticoagulants, ne peuvent tenir qu'à la technique de dosage employée par ces auteurs pour reconnaître les faibles variations en glucides dues à l'utilisation de fluorure à 2 p. 1.000.

Pour nous mettre à l'abri d'une erreur de dosage due à la

présence du fluorure, nous avons fluoré le plasma témoin après séparation des globules rouges au même taux que le sang total.

On voit que, malgré les inconvénients des dosages sur de faibles quantités, la diminution du glucose est sensiblement du même ordre de grandeur que celle des protéides.

Man et Guildea [130] ont fait une constatation analogue pour les acides gras : le taux de ces derniers est plus grand dans le sérum et le plasma hépariné que dans le plasma oxalaté. Schmidt [167], en confirmant les constatations des auteurs précédents, trouve que le taux des phospholipides est de 10 à 12 p. 100 moindre dans le plasma du sang oxalaté à 2,4 p. 1.000 que dans le plasma du sang hépariné. Man et Guildea n'acceptent pas l'interprétation de ce phénomène donnée par Mac Lean et Mac Lean [125] qui pensent qu'il s'agit ici d'une précipitation des phospholipides par l'oxalate et, d'après eux, ces variations proviennent de la modification du volume des globules rouges par l'oxalate.

Sperry et Schoenheimer [179], à la suite du travail de Schmidt, dosent le cholestérol sur le plasma hépariné, oxalaté et sur le sérum d'un même sujet ; ils constatent que le plasma oxalaté est plus pauvre en cholestérol total que le plasma hépariné ou le sérum et que le cholestérol, libre et combiné, a diminué dans les mêmes proportions. Ils adoptent l'interprétation de Schmidt et admettent que cette différence est due à l'altération du volume globulaire par l'oxalate et ils reconnaissent que le plasma oxalaté ne peut pas être utilisé pour le dosage du cholestérol.

Aux mêmes résultats sont arrivés tout récemment Gardner, Gainsborough et Murray [57] en dosant le cholestérol dans le sang oxalaté et hépariné. L'addition d'oxalate à 2. p. 1.000 provoque une diminution du taux de cholestérol d'environ 4 p. 100, par rapport au sang hépariné, et ces auteurs estiment que le dosage par ce dernier moyen est correct ; cependant nous savons que l'héparine, comme tous les autres anticoagulants, provoque une diminution du taux de protéides variant de 2 à 4 p. 100 quand on l'utilise, comme ils l'ont fait, à des doses de 150 à 200 milligrammes par litre. Il s'agit

réellement d'une dilution du plasma. D'ailleurs l'expérience suivante en fournit la démonstration.

EXPÉRIENCE N° 31. — 5 cent. cubes de plasma témoin et 5 cent. cubes de plasma de sang oxalaté sont desséchés jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique. On pratique sur une fraction du plasma témoin et sur la même quantité du plasma oxalaté, les dosages d'oxalate par la méthode classique. L'excès d'oxalate existant dans le plasma oxalaté ainsi déterminé, on soustrait du poids du plasma oxalaté le poids d'oxalate contenu dans 5 cent. cubes.

Finalement, 5 cent. cubes de plasma témoin pèsent 0 gr. 3668 et le plasma oxalaté, diminué du poids de l'oxalate dont le taux est de 106 centigrammes par 100 centimètres cubes de plasma, égale 0,3276. Le plasma oxalaté contient donc moins de matière sèche que le plasma témoin, soit 0 gr. 3668 — 0 gr. 3276 = 0 gr. 0392. La perte de matière sèche est égale à 10,7 p. 100. Le dosage des protéides de ces deux plasmas a donné les résultats suivants : le plasma témoin contient, par litre, 62 gr. 10 et le plasma oxalaté 55 gr. 2. La diminution est égale à 11,1 p. 100, chiffre sensiblement identique à celui qu'on trouve comme perte en matière sèche.

Le plasma du sang traité par l'oxalate contient donc réellement moins de substances dissoutes que le plasma témoin.

Ce sont les modifications de la concentration moléculaire du plasma qui régissent les échanges d'eau entre plasma et globules.

Les échanges d'eau entre deux solutions séparées par une membrane semi-perméable sont sous la dépendance : 1° de la concentration de deux solutions, 2° de la perméabilité de la membrane aux ions dont la répartition est régie par la loi de Donnan. Dans le sang, il existe un équilibre osmotique entre le plasma et les globules. L'addition d'un anticoagulant en poudre ou en solution concentrée dans le sang, en augmentant la concentration moléculaire du plasma, rompt cet équilibre. Pour revenir à un nouvel équilibre, une certaine quantité d'eau doit passer des globules dans le plasma en même temps que se produit un certain échange ionique entre les deux phases.

Par suite, non seulement les anticoagulants mais toutes les substances qui se dissolvent dans le plasma produiront le

même effet, électrolytes ou substances non ionisées. Voici deux exemples que nous donnons ici :

	PROTEIDES par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
EXPÉRIENCE N° 32.		
Plasma témoin	63,5	
Plasma du sang additionné de NaCl à 3 p. 1.000.	59,6	— 6,1

Nous savons que l'héparine en solution n'apporte dans le plasma qu'un changement négligeable. Aussi comme témoin nous avons utilisé le plasma hépariné parce que la dissolution de NaCl et celle du glucose exigent trop de temps pour qu'on puisse la faire dans le plasma simple.

	PROTEIDES par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
EXPÉRIENCE N° 33.		
Plasma témoin	67,0	
Plasma hépariné avec une solution d'héparine à raison de 150 milligrammes par litre	67,0	0
Plasma hépariné + NaCl en concentration finale de N/5	55,2	— 17,6
Plasma hépariné + glucose en dilution finale de N/5	55,0	— 17,9

Au cours d'expériences ultérieures, nous aurons l'occasion d'apporter de nombreux exemples du même genre pour d'autres substances et nous estimons qu'il est inutile d'y insister davantage ici.

Il est évident qu'en diminuant la concentration moléculaire du plasma, nous produisons le phénomène inverse, c'est-à-dire le passage de l'eau du plasma vers les globules. Cette diminution de la concentration moléculaire peut être obtenue de deux manières différentes, soit en diluant directement le plasma avec de l'eau, soit en le dialysant dans un sac de collodion.

EXPÉRIENCE N° 34. — On prend 20 cent. cubes de sang hépariné à 150 milligrammes/litre et on le partage en deux tubes. Dans l'un, on ajoute 2 cent. cubes d'une solution de chlorure de sodium à 8,5 p. 1.000, solution que l'on peut considérer comme approximativement isotonique. Dans l'autre, on ajoute, goutte à goutte, 2 cent.

cubes d'une solution de NaCl à 3. p. 1.000, solution largement hypotonique. Nous avons alors :

	PROTÉIDES en grammes par litre	AUGMENTATION
1° Plasma du sang additionné d'une solution de NaCl à 8,5 p. 1.000	48,2	
2° Plasma du sang additionné d'une solution de NaCl à 3 p. 1.000	50,2	+ 4,15

Le plasma du sang rendu hypotonique est donc plus riche en protéides que le sang dont la concentration n'a pas ou n'a que peu varié.

Dans les expériences où l'on rend le plasma hypotonique par dialyse, les résultats sont encore plus nets.

Expérience n° 35. — On prélève le sang d'un lapin. Une partie de ce sang est centrifugée immédiatement pour procéder au dosage des protéides et aux mesures cryoscopiques. Le reste du sang est hépariné à raison de 150 milligrammes/litre. Une partie du plasma du sang hépariné, prélevé par centrifugation, est dialysé dans un sac de collodion contre l'eau distillée pendant trente-cinq minutes, dans un dialyseur de Machebœuf et Sandor. On exerce sur le plasma une pression de 5 cm. de Hg. pour éviter la dilution de celui-ci par endosmose. On a ainsi deux sortes de plasma, le plasma du sang hépariné et dialysé et le plasma du même sang hépariné et non dialysé. On les remet respectivement sur les globules rouges qui en provenaient. L'abaissement du point de congélation et le pH de toutes ces fractions ont été mesurés. Le pH a été déterminé par la méthode électrométrique à l'aide de l'électrode à hydrogène de Sannié.

	Δ en degrés	pH à 20°	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS en p. 100
Plasma du sang hépariné	— 0,59	7,96	64,20	
Plasma du sang hépariné et dialysé	— 0,39	7,93	64,00	— 0,3
Plasma du sang hépariné et remis sur ses globules rouges	— 0,60	7,95	64,30	— 0,16
Plasma du sang hépariné et dialysé et remis sur ses globules rouges	— 0,51	7,93	73,80	+ 15,0

On voit donc que le plasma rendu hypotonique s'enrichit en protéides au contact des globules rouges, comme on pouvait déjà le prévoir. L'eau du plasma passe dans les globules jusqu'à ce que le nouvel équilibre soit atteint.

Modifications des volumes respectifs du plasma et des globules.

La mesure du volume globulaire paraît, au premier abord, très simple. Plusieurs méthodes ont été proposées pour cette évaluation. La plus courante et la plus anciennement connue est celle de l'hématocrite. Les autres sont : la réfractométrie, la conductibilité électrique du sang, la viscosité, la colorimétrie, le dosage sur le sang additionné de sels. Aucune de ces méthodes n'est exempte d'erreur. La réfractométrie, la dilution du sang par des solutions salines, la conductibilité [172], la viscosité se montrent, d'après Ponder et Saslow [150] qui les ont pratiquées, nettement insuffisantes.

Jenkins [98] additionne le sang rendu incoagulable d'une solution d'hémoglobine en quantité déterminée. Il centrifuge et mesure le degré de dilution de l'hémoglobine dans le plasma par rapport à une solution standard. Les résultats ainsi obtenus présentent, par rapport à la méthode de l'hématocrite, une différence en moins qui est de 7 à 26 p. 100 pour le volume globulaire. Toutes ces méthodes exigent la dilution du sang par des solutions salines ; il est alors évident qu'à moins d'utiliser une solution rigoureusement isotonique, le volume globulaire se trouve modifié avant même de commencer la mesure. Or, couramment on évalue de 8 à 9 grammes pour 1.000 la teneur en NaCl d'une solution isotonique pour les globules rouges : Hampson et Maizels [77] l'évaluent à 7 gr. 2 p 1.000, alors que Ponder et Saslow [150] l'estiment à 11 gr. 2 par litre

Christensen et Warburg [27] ont étudié la composition des solutions salines dans lesquelles le volume globulaire ne change pas. Ils ont démontré que les solutions de sels d'oxalate ou de citrate au même Δ que le sérum ne sont pas réellement équilibrées et que les globules rouges mis en suspension dans ces solutions diminuent de volume. Cette diminution dans des solutions considérées comme isotoniques atteint 10 p. 100 pour le citrate à 2 p. 100 et 4 p. 100 pour l'oxalate à 1,3 p. 100. Ils admettent, d'après la théorie

de Hamburger, que le changement de pH du sang par départ de l'acide carbonique est la principale source de ces modifications. Ils arrivent à conclure qu'il n'est ni suffisant, ni nécessaire que la solution soit du même Δ que le sérum pour que le volume globulaire reste constant. Il est indispensable d'introduire des tampons pour éviter le changement du pH du sang. Étant donné que nous sommes si peu renseignés sur la véritable valeur d'une solution isotonique, toutes les méthodes de mesure du volume globulaire qui commandent la dilution du sang sont à condamner.

La méthode colorimétrique que Ponder et Saslow [**150**] estiment précise, a cependant donné entre leurs mains des résultats étranges, à savoir que le volume des globules rouges ne diminue pas dans une solution hypertonique, alors que toutes les observations faites avec les autres méthodes prouvent le contraire.

La méthode à l'hématocrite, plus simple, donne les résultats les plus constants. Les mesures ne sont que relatives car le volume trouvé dépend du nombre de tours et du temps de centrifugation, de la viscosité du milieu, etc... Millar [**134**] a étudié cette méthode et en fait une critique serrée, de même que Ponder et Saslow [**150**]. En effet, cette méthode est loin d'être parfaite, comme on le voit par les valeurs dues à différents auteurs pour le volume moyen des globules rouges de l'homme en $m\mu^3$: Capps : 100 [**25**] ; Millar : 70 [**134**] ; Limbeck : 68 [**117**]. Les différences dépassent 30 p. 100.

En conclusion, nous ne possédons pas de méthode capable de déterminer avec précision le volume globulaire et le volume plasmatique. Comme il fallait néanmoins en choisir une, nous avons pris celle à l'hématocrite comme la moins erronée.

Limbeck observe que le volume globulaire subit des modifications en rapport avec la tonalité du milieu environnant : les solutions hypertoniques amènent une diminution du volume globulaire, tandis que le contraire se produit dans les solutions hypotoniques.

Depuis, ce fait a été signalé maintes et maintes fois. Wipple et ses collaborateurs, en 1920, indiquent que le volume globu-

laire diminue de plus en plus quand on ajoute au sang des doses de plus en plus fortes d'oxalate de soude. Eisenmen [**44**], Man et Gildea [**130**], Schmidt [**167**], Wilander [**197**], etc., ont remarqué que le volume globulaire est plus grand dans le sang hépariné que dans le sang oxalaté. Rossdale indique aussi que l'oxalate réduit plus fortement le volume globulaire que le citrate quand ces corps sont utilisés aux mêmes concentrations. Ponder, soit seul, soit avec Saslow ou Robinson [**147-151**], a étudié aussi les variations du volume globulaire dans les milieux de tonicité différente.

Nous avons voulu vérifier ces variations du volume globulaire en fonction de la tonicité du milieu. Toutes nos mesures ont été faites comparativement avec le sang hépariné comme témoin, pour la raison que nous avons exposée plus haut.

La centrifugation du tube de l'hématocrite a été faite à 9 000-10.000 tours-minute pendant quarante-cinq minutes. La colonne des globules rouges, quand la concentration du sang n'est pas très élevée, devient transparente après ce temps de centrifugation. Phénomène désigné sous le nom de critérium de Köppe [**104**].

Nous allons exposer une de nos expériences qui ont toutes donné des résultats sensiblement identiques

Expérience n° 36. — Le sang d'un lapin, prélevé par ponction carotidienne et hépariné à raison de 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 0,75 p. 100, est séparé en quatre parties. On additionne la première partie d'oxalate de potassium en poudre à raison de 10 p. 1.000, la deuxième de fluorure et la troisième de citrate de sodium au même titre que l'oxalate. Le quatrième échantillon nous sert de témoin.

On pratique au bout de quinze minutes, sur ces 4 échantillons bien mélangés, les mesures du volume globulaire et le dosage d'azote.

	Protides par litre de plasma en grammes	Volume globulaire en p. 100
Plasma hépariné à 0,15 p. 100	62,10	38
Plasma du sang oxalaté à 10 p. 1.000	55,20	30
Plasma du sang fluoré à 10 p. 1.000	51,50	25
Plasma du sang citraté à 10 p. 1.000	55,90	32,5

Il est facile, en calculant les protéines contenues dans

100 cent. cubes de sang, de montrer que la quantité totale des protéides du plasma reste la même dans tous ces échantillons. Dans le plasma hépariné, nous avons 0,0621 de protéides par centimètre cube ; et comme le volume des globules = 38 p. 100, le plasma équivaut à 62 p. 100 du volume du sang, par conséquent dans 1.000 cent. cubes de sang, nous aurons 0,0621 × 62 × 10 = 38 gr. 5 de protéides plasmatiques. Les calculs faits avec le plasma oxalaté donnent 0,0552 × 70 × 10 = 38,6 ; le plasma fluoré 38 gr. 6, le plasma citraté 38 gr. 2. Contrairement aux expériences de Scott et Lehman, nous ne trouvons pas ici de disparition des protéides totaux dans les milieux hypertoniques.

Les variations observées qui ne dépassent pas ± 2 p. 100 dans nos divers échantillons résultent de l'erreur inséparable de la méthode à l'hématocrite.

On voit que pour avoir le taux des protéides du sang, il faut tenir compte du volume des globules.

Le dosage des protéides après addition au sang d'anticoagulants en solution reste aussi exact quand on tient compte de la dilution introduite.

Expérience n° 37. — On arrête la coagulation d'un sang de lapin en y ajoutant une solution d'héparine à 0,75 p. 100 à raison de 0 gr. 150 p. 1.000. Ce sang est divisé en deux parties. L'une est additionnée au 1/10 d'une solution d'oxalate de potassium saturée, l'autre sert de témoin. Le plasma des deux parties est séparé par centrifugation après quinze minutes de repos. Pour le plasma hépariné, nous avons obtenu les résultats suivants :

Volume plasmatique : 62 p. 100. Volume globulaire : 38

Taux de protéides dans le plasma : 6,21 p. 100.

1 cent. cube de plasma contient donc : 0,0621 de protéides.

Dans 1.000 cent. cubes de sang, nous aurons : 0,0621 × 62 × 10 = 38,5 de protéides.

Pour le plasma oxalaté, on a également :

Volume plasmatique : 75 p. 100. Volume globulaire : 25.

Taux de protéides : 4.60 p. 100 de plasma.

1 cent. cube de plasma contient donc : 0,046 de protéides.

Dans 100 cent. cubes de sang, nous aurons : 0,046 × 82,5 = 38 gr., en faisant la correction que nécessite la modification du volume initial par addition de 10 cent. cubes de la solution d'oxalate pour 10 cent. cubes de sang. Le volume réel sera donc 75 p. 100 de 110 = 82 cent. cubes 5.

Les nombreux dosages que nous avons pratiqués de cette façon nous ont toujours donné des résultats dont l'erreur ne dépassait pas plus ou moins 2 p. 100.

Perméabilité sélective des globules rouges aux différents ions.

L'échange d'eau entre globules et plasma n'est pas le seul phénomène qu'on observe quand on change la tonicité du plasma. Il passe aussi certains ions. La question de la perméabilité globulaire est très discutée. Hamburger et Bubanovic [**74**], Ashby [**4**], Ponder et Robinson [**149**], Davson [**32-36**] prétendent que la paroi des globules rouges est perméable aux cations. Mais la plupart des autres auteurs : Mond [**137**], Kerr [**101**], Henderson [**83**], Wakeman, Eisenman et Peters [**191**], Van Slyke, Wu et Mac Lean [**189**], Gürber [**67**], Hamburger [**73-75**], Falta et Richter-Quittner [**46**], Maizels [**127**], Halverson, Möhler et Bergeim [**70**] estiment que la paroi globulaire est pratiquement imperméable aux cations quand on se place dans des conditions assez voisines de l'état physiologique normal, c'est-à-dire quand les globules rouges ne sont pas altérés (pH, trop grande concentration saline, séparation des protéides du plasma, etc...).

La perméabilité aux anions paraît moins discutée. Hamburger [**73**], Maizels [**128-129**], Van Slyke et Cullen [**188**], Fredericia [**54**], Henderson [**83**] et beaucoup d'autres auteurs indiquent que les globules rouges sont perméables aux anions si le pH du sang n'a pas subi de grandes variations vers l'alcalinisation. La perméabilité aux anions croît rapidement avec l'acidification du milieu. Cependant Levy, Mignon et Haffner [**115**] n'arrivent pas, par leur méthode, à démontrer la perméabilité de la paroi globulaire au chlore.

Dans nos expériences, la dilution du plasma par l'eau après addition de sel au sang globulaire, indique une nouvelle répartition ionique, qui est régie par le passage de l'eau et par la perméabilité sélective de la membrane globulaire. Si un même échantillon de sang est additionné de sels différents,

à molarité égale, la diminution respective des protéides trouvées nous renseignera sur le passage des différents ions à travers la paroi globulaire.

Expérience n° 38, faite sur le sang de mouton hépariné à 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 5 p. 100. Le sang est réparti en douze tubes à centrifugation par portions de 10 cent. cubes mesurées avec précision. On ajoute dans chaque tube exactement 2 cent. cubes d'une solution de NaCl ou de glucose à molarité différente. On utilise les solutions de 3 N, 2 N, N, N/2, N/4 et N/10. On agite bien et on laisse les mélanges à la température du laboratoire pendant trente minutes avant de les centrifuger. On pratique alors sur le plasma le dosage d'azote protéidique et on détermine le Δ de tous les échantillons de plasma. Voici les résultats.

	Δ du plasma en degrés	Protéides par litre de plasma en grammes
Pour le NaCl :		
Sang + la solution de NaCl à 3 N	— 2,73	49,00
Sang + la solution de NaCl à 2 N	— 1,99	49,44
Sang + la solution de NaCl à 1 N	— 1,24	51,19
Sang + la solution de NaCl à N/2	— 0,82	53,38
Sang + la solution de NaCl à N/4	— 0,69	54,69
Sang + la solution de NaCl à N/10	— 0,58	56,88
Pour le glucose :		
Sang + la solution de glucose à 3 N	— 1,84	49,44
Sang + la solution de glucose à 2 N	— 1,37	50,75
Sang + la solution de glucose à 1 N	— 0,93	52,50
Sang + la solution de glucose à N/2	— 0,68	55,12
Sang + la solution de glucose à N/4	— 0,61	56,00
Sang + la solution de glucose à N/10	— 0,55	57,31

En représentant ces résultats graphiquement, on constate un phénomène curieux : Les chiffres trouvés expérimentalement pour le glucose ou pour le chlorure de sodium se placent sur une même courbe. La diminution des protéides est donc identique pour ces deux corps quand le Δ du plasma est le même. Cela veut dire que les molécules de NaCl ou les molécules de glucose se comportent de la même façon vis-à-vis de la paroi globulaire (Voir graphique n° 1). La dilution de protéides du plasma indique que l'eau globulaire passe vers le plasma ; par conséquent la paroi globulaire est peu ou pas perméable pour NaCl et pour le glucose. Nos expé-

riences avec d'autres sels tels que le chlorure de potassium l'iodure de potassium, le bromure de potassium et le nitrate de sodium donnent des résultats analogues. Il en résulte que dans les conditions de nos expériences nous n'observerons pas de perméabilité globulaire appréciable ni pour les électrolytes, ni pour les molécules non ionisables des corps précités. Cependant ces constatations se trouvent en contradiction avec ce que nous savons sur le métabolisme des globules rouges.

Cherbuliez [26] a étudié la concentration moléculaire des globules rouges et du plasma en variant la molarité de ce dernier. Il trouve que le Δ des globules reste toujours un peu inférieur à celui du plasma, phénomène déjà connu par les expériences de Moor et Roaf [135] et de Collip [28] et critiqué par d'autres auteurs. Cependant la concentration moléculaire des globules suit, tout en restant légèrement au-dessous, celle du plasma.

Pour Régnier [58], ces expériences démontreraient que les sels peuvent pénétrer dans les globules rouges ou s'en échapper pour maintenir la concentration moléculaire des globules. Que la paroi globulaire soit perméable ou non aux différents sels, nous ne discutons pas cette hypothèse, mais les expériences de Cherbuliez s'expliquent tout aussi bien par passage d'eau des globules vers le plasma quand on augmente la concentration moléculaire de celui-ci et inversement par passage de l'eau plasmatique dans les globules quand le Δ plasmatique est plus faible que celui des globules.

La paroi globulaire perméable a l'eau, comme nous l'avons vu, est aussi perméable a l'urée. — On sait que les globules rouges s'hémolysent dans des solutions isotoniques d'urée. Nous avons essayé d'ajouter au sang des solutions fortement hypertoniques, 2N, d'urée sans empêcher l'hémolyse de se produire. La solution d'urée se comporte vis-à-vis des globules tout à fait comme l'eau distillée. Pour étudier de plus près ce phénomène, nous avons adopté la méthode suivante :

EXPÉRIENCE N° 39. — On prépare une solution de NaCl N/5. Cette solution est divisée en trois parties : l'une sert de témoin, la deuxième est additionnée d'urée en poudre, de façon à avoir une solution d'urée égale à N/5, et la troisième est traitée pareillement avec du glucose, corps non ionisable comme l'urée. D'autre part, on prend du sang de lapin, hépariné à 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 5 p. 1.000. 2 cent. cubes des trois solutions précédentes sont ajoutés respectivement à 10 cent. cubes de sang. On agite et on centrifuge après une demi-heure. Puis on pratique le dosage de l'azote sur le plasma précipité par l'acide trichloracétique et lavé à cinq reprises pour éliminer l'urée. On a pris soin de mesurer les volumes globulaires de chaque mélange par l'hématocrite. Voici les résultats :

	NaCl N/5	NaCl N/5 + urée N/5	NaCl N/5 + glucose N/5
Volume globulaire p. 100	25	25	23
Protéides par litre de plasma, en grammes	48,15	48,02	46,91
Protéides par litres de sang, en grammes	36,12	36,05	36,12

Cette expérience nous indique que l'urée ne provoque ni variation du volume globulaire, ni diminution du taux de protéides plasmatiques, qu'elle traverse la paroi globulaire très facilement et que la concentration moléculaire restant la même à l'extérieur et à l'intérieur du globule, tout appel d'eau du globule vers le plasma, donc toute dilution de ce dernier, se trouvent écartés.

L'urée n'intervient donc pas dans l'équilibre osmotique des globules rouges. Grâce à sa grande diffusibilité, elle traverse facilement la paroi cellulaire. Quand on suspend les globules rouges dans une solution même hypertonique d'urée sans autres sels, l'urée se répartit uniformément dans les deux phases et le contenu des globules, renfermant les divers sels peu ou pas diffusibles, devient ainsi hypertonique par rapport au milieu extérieur. L'eau pénètre dans les globules et provoque l'hémolyse. Tout se passe sensiblement comme dans l'eau pure.

RÔLE DE LA CONCENTRATION EN IONS H^+ SUR LA PERMÉABILITÉ GLOBULAIRE. — Comme, dans les expériences ci-dessus, nous avons utilisé le sang conservé à l'air sans aucune précaution spéciale, et que le départ de l'acide carbonique fait monter

le pH du sang de 7,35 à 7,5 — 8,0, il ne manquait pas d'intérêt de rechercher l'influence des variations du pH sur la perméabilité globulaire.

Expérience n° 40. — On prépare une solution d'acide chlorhydrique dont on ajuste le Δ à — 3°80 ; les mesures ont été faites sur la solution diluée à 1 pour 5, dont le Δ est égal à — 0°76. Une solution de NaCl est ajustée exactement au même Δ. Ces deux solutions sont mélangées en proportions différentes.

1° 9 cent. cubes 1/2 de la solution de NaCl + 1/2 cent. cube de solution acide ;

2° 9 cent. cubes de NaCl + 1 cent cube d'acide ;

3° 8 cent. cubes de NaCl + 2 cent. cubes d'acide, et ainsi de suite 3, 4 et 5 cent. cubes d'acide pour 7, 6, 5 de la solution de NaCl.

On prélève 150 cent. cubes de sang de lapin qu'on rend incoagulable avec une solution d'héparine à 5 p. 100 à raison de 150 milligrammes d'héparine par litre. Le sang est réparti par 15 cent. cubes dans 7 tubes à centrifugation. Dans le premier tube on ajoute 2 cent. cubes de solution de NaCl pure, dans les suivants 2 cent. cubes de chaque mélange préparé comme nous l'avons dit. On mélange bien le sang avec les solutions et on abandonne les tubes à la température du laboratoire pendant une heure. Le volume globulaire est déterminé à l'hématocrite. Ensuite, le plasma obtenu par centrifugation est analysé à trois points de vue : 1° on dose l'azote protéidique ; 2° on détermine le Δ du mélange ; 3° on mesure le pH de ces plasmas à l'aide d'une électrode à l'hydrogène de Sannié. Voici les résultats que nous avons obtenus.

15 cent. cubes de sang additionnés de 2 cent. cubes de	pH du plasma	Protéides par litre de plasma en grammes	Protéides par litre de sang en grammes	Volume global	Δ en degrés
NaCl	7,95	56,00	42,56	24,0	— 1,015
NaCl 19 parties. HCl 1 partie	7,77	56,44	42,61	24,5	— 1,010
NaCl 9 parties. HCl 1 partie	7,56	56,87	42,36	25,5	— 1,010
NaCl 8 parties. HCl 2 parties.	7,35	58,19	42,47	27	— 0,965
NaCl 7 parties. HCl 3 parties.	6,85	59,94	42,25	30,5	— 0,920
NaCl 6 parties. HCl 4 parties.	6,03	66,06	42,93	35	— 0,895

Dans le dernier mélange le plasma est légèrement teinté d'hémoglobine ; avec des solutions encore plus riches en acide, la destruction

des globules rouges est trop importante pour qu'on puisse en tirer une conclusion.

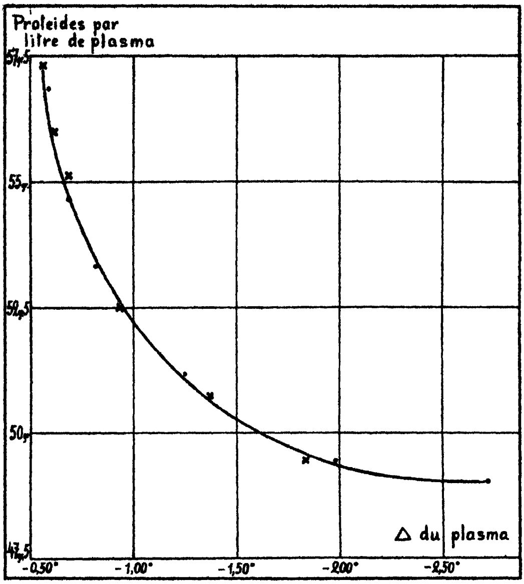
On voit qu'avec l'abaissement du pH, le plasma devient de plus en plus riche en protéides. L'augmentation de la concentration moléculaire du plasma varie dans ses effets à des pH différents. En milieu acide le passage de l'eau globulaire vers le plasma se produit avec moins d'intensité qu'en milieu alcalin, ce qui paraît être en accord avec la théorie de Warburg et de Van Slyke sur la répartition de l'eau entre les globules et le plasma. On sait qu'en acidifiant le sang on augmente la concentration moléculaire des globules plus fortement que celle du plasma.

Le Δ du plasma s'abaisse légèrement avec l'introduction de quantités de plus en plus importantes d'acide, mais ces variations qui ne dépassent pas 0°120 et sont beaucoup trop faibles pour justifier les changements importants qui se produisent dans la concentration du plasma en protéides, comme on peut le voir par le graphique n° 1. On ne peut pas parler ici non plus de passage des protéides au travers de la paroi globulaire car la quantité de protéides totaux du plasma, rapportée au litre de sang, reste constante.

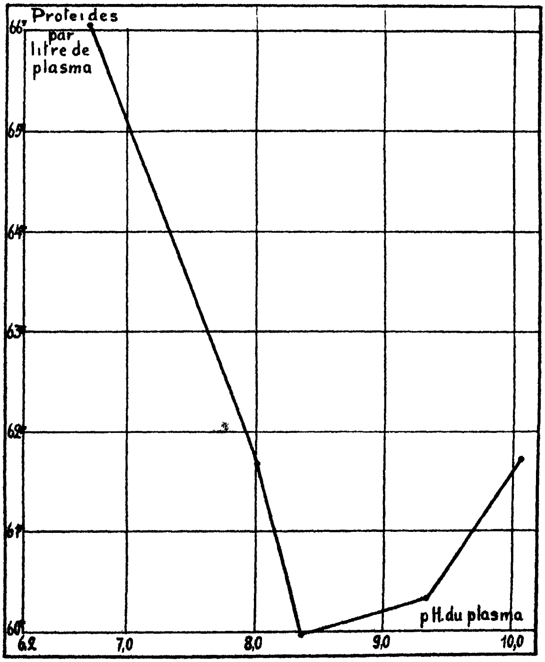
Existe-t-il un minimum de perméabilité pour les globules quand on augmente la concentration du milieu en ions OH^- ? Pour cette expérience nous avons utilisé aussi l'acide chlorhydrique qui donne de meilleurs résultats que l'acide oxalique par exemple. Celui-ci produit une hémolyse rapide de globules à des pH moins élevés que l'acide chlorhydrique.

Expérience n° 41, faite sur le sang de mouton. — Trois solutions de HCl, de NaOH et de NaCl sont ajustées exactement au même Δ, comme précédemment. Cette fois, le point de congélation des solutions est égal à —4°00. On prépare, comme dans l'expérience ci-dessus, des mélanges de NaCl avec l'acide ou la soude. Le sang de mouton est hépariné à 150 milligrammes par litre à l'aide d'une solution à 5 p. 100. Le plasma est séparé trente minutes plus tard et on procède aux mêmes examens.

Le plasma se trouve le plus dilué à pH 8,35. A ce moment, la perméabilité pour NaCl passe par un minimum. A des pH plus faibles ou plus forts, le plasma se concentre, comme le graphique n° 2 l'indique. Comme dans l'expérience précé-



Graphique n° 1. — En ordonnées le poids de protéides par litre de plasma, en abscisses les Δ du plasma. Les points indiquent les chiffres trouvés avec le chlorure de sodium, les croix, les valeurs avec le glucose.



Graphique n° 2. — En ordonnées le poids des protéides contenus dans 1 litre de plasma; en abscisses, les pH du plasma.

20 CENT. CUBES de sang additionnés de 2 cent. cubes de	pH du plasma	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	PROTÉIDES par litre de sang en grammes	VOLUME global	Δ en degrés
NaCl 5 parties. . . HCl 5 parties. . .	6,38	66,06	46,90	29	— 0,77
NaCl	8,02	61,69	46,88	24	— 0,91
NaCl 9 parties. . . NaOH 1 partie . . .	8,37	59,94	47,05	21,5	— 0,89
NaCl 7 parties. . . NaOH 3 parties. . .	9,38	60,37	47,09	22	— 0,86
NaCl 5 parties. . . NaOH 5 parties. . .	10,05	61,69	46,88	24	— 0,80

dente, on ne peut parler davantage de passage des protéides, la quantité de ceux-ci restant, comme ci-dessus, constante dans le plasma pour un volume donné de sang. Les variations du Δ, ne dépassant pas 0°14, ne peuvent pas nous expliquer à elles seules des changements aussi importants dans la concentration du plasma. D'ailleurs, nous voyons qu'à pH 8,02 et à Δ — 0°91, le plasma est plus riche en protéides qu'à pH 9,38 et à Δ — 0°86.

Nous devons donc conclure de ces essais, que la perméabilité globulaire passe par un minimum qui se trouve aux environs de pH 8,3. Dans le milieu acide, la perméabilité croît rapidement, dans le milieu alcalin elle augmente plus faiblement Quand on opère *in vitro*, les résultats varient fortement suivant le pH du milieu utilisé. Il n'y a rien d'étonnant à ce que, dans ces conditions, la question de la perméabilité globulaire ait donné lieu aux travaux les plus contradictoires.

Nous n'avons pas recherché la nature des ions qui traversent les globules à des pH différents. De nombreux auteurs ont vu que l'acidité du milieu est favorable au passage des anions. Mond [**137**], quoique ces travaux soient très discutés, a montré, par des dosages directs, que la paroi globulaire devient perméable aux cations en milieu alcalin, mais que les anions ne passent plus.

Ces expériences nous montrent qu'on peut, pour l'étude de la perméabilité globulaire, introduire dans le sang diverses

substances qui, par la dilution du plasma, vont nous indiquer leur degré de diffusibilité .

Conservation du sang additionné d'anticoagulants.

Dans les expériences citées jusqu'à présent, la séparation du plasma des globules après addition d'anticoagulants a été faite au bout de quinze minutes. Il est important d'étudier comment évolue le phénomène avec le temps. On est limité ici par la fragilité des globules rouges. Le plus souvent, le sang additionné d'anticoagulants accuse une hémolyse plus ou moins importante au bout de vingt-quatre, au plus tard quarante-huit heures, et le plasma devient inutilisable pour l'analyse. D'ailleurs, comme nous le verrons, le résultat se stabilise très rapidement.

Expérience n° 42. — On prend 40 cent. cubes de sang de lapin. On en centrifuge 10 cent. cubes dans un tube paraffiné pour avoir le plasma témoin. Les 30 cent. cubes restants sont additionnés d'oxalate de potasse à raison de 5 p. 1.000. Après avoir mélangé soigneusement, on divise le sang en trois parties. On centrifuge la première au bout de vingt-quatre heures. Pendant ce temps, le sang a été conservé à la glacière dans des tubes bouchés au liège. Voici les résultats :

	Protéides par litre de plasma en grammes	Variation en p. 100
Plasma témoin	69,9	
Plasma du sang oxalaté à 5 p 1 000 et conservé pendant 15 minutes	63,3	— 9,4
Plasma du sang oxalaté à 5 p. 1.000 et conservé pendant 6 heures	63,4	— 9,3
Plasma du sang oxalaté à 5 p 1 000 et conservé pendant 24 heures	63,4	— 9,3

On constate donc que la diminution s'est produite au bout de quinze minutes et ne varie plus avec le temps.

Expérience n° 43. — Des résultats analogues se montrent avec le citrate de soude, comme l'indique l'expérience suivante. Cette fois, nous avons introduit l'anticoagulant en solution saturée à raison de 1 cent. cube pour 10 de sang de lapin. Une partie est centrifugée

à 10 tours/minute immédiatement après l'addition d'anticoagulant, pendant quatre minutes, de telle sorte que le plasma est séparé des globules en cinq minutes. L'autre partie est centrifugée au bout de trois heures. Le sang conservé pendant vingt-quatre heures est très hémolysé et abandonné. Voici les résultats :

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATION en p. 100
	—	—
Plasma témoin	62,0	
Plasma du sang citraté séparé au bout de 5 minutes.	45,1	
Plasma du sang citraté séparé au bout de 3 heures.	46,0	+ 2

La quantité de protéides aurait plutôt légèrement augmenté au bout de trois heures. Cela peut tenir à deux causes : soit simplement à une légère destruction des globules, soit encore à une absorption par les globules d'une certaine quantité d'eau.

EXPÉRIENCE N° 44. — Dans 20 cent. cubes de sang de mouton, on verse 0,15 p. 1.000 d'une solution d'héparine à 5 p. 100 et 4 cent. cubes d'une solution normale de chlorure de sodium. Une partie du sang est centrifugée et analysée immédiatement, l'autre vingt-quatre heures plus tard. Les résultats ont été les suivants :

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes
	—
Sang analysé immédiatement	50,2
Sang analysé après vingt-quatre heures	50,2

Comme pour le citrate et l'oxalate, la dilution du plasma est presque instantanée et ne varie pas avec le temps.

Cette rapidité d'équilibre n'a rien de surprenant. La paroi du globule rouge ne doit pas dépasser au plus quelques centièmes de μ d'épaisseur et il est évident que dans ces conditions les échanges sont très rapides entre les globules rouges et le milieu environnant

Discussion des travaux de Scott, de Bellis et Scott et de Lehman et Scott [89, 111, 171].

Ces auteurs prétendent que la paroi globulaire est perméable aux protéides du plasma. A l'appui de leur hypothèse,

ils citent leurs expériences de dosages des protéides dans le plasma oxalaté et le sérum d'un même animal où ils trouvent que le sérum est relativement plus riche en protéides que le plasma oxalaté. Nous avons vu déjà dans le chapitre I que ces résultats s'expliquent tout autrement et que la diminution constatée dans le plasma n'est nullement provoquée par passage de protéides au cours de la coagulation. Elle se produit sous l'influence de la venue d'eau des globules rouges causée par l'augmentation de la concentration moléculaire du plasma due à l'addition d'anticoagulant. Le plasma du sang non traité est toujours plus riche en protéine que le sérum correspondant.

Dans d'autres séries d'expériences, ils diluent le sang dans des solutions hypotoniques ou soi-disant isotoniques de glucose et de différents sels. Ils observent alors que la quantité des protéides contenus dans le plasma augmente relativement avec les dilutions. Inversement, ils constatent que la dilution dans des solutions hypertoniques diminue relativement les protéides plasmatiques. On peut faire deux objections à ces expériences : 1° La méthode à l'hématocrite que les auteurs utilisent pour les déterminations du volume globulaire ne peut pas, comme nous l'avons vu déjà, donner des résultats tout à fait précis. Les erreurs sont surtout manifestes quand on travaille sur des solutions de densité et de viscosité très différentes, parce que, ainsi que l'indique Ege [**41**], les globules se sédimentent beaucoup plus difficilement dans des solutions hypertoniques que dans des solutions iso- ou hypotoniques.

L'influence de la viscosité du sang sur la mesure du volume globulaire par l'hématocrite a été étudiée par Nygaard, Wilder et Berkson [**140**] qui ont trouvé qu'on peut exprimer la relation entre le volume globulaire et la viscosité du plasma à l'aide d'une fonction linéaire. Cela indique avec quelle prudence il faut interpréter les résultats des mesures à l'hématocrite pour déterminer le volume globulaire, surtout quand on travaille sur des solutions de composition différente. Les erreurs relatives sont faibles pour des solutions de compositions comparables, mais elles deviennent

importantes dans le cas contraire. Scott et Lehman et Scott donnent des formules qui, d'après les volumes globulaire et plasmatique, permettent de calculer le volume initial du sang. L'application de ces formules entraîne de grosses différences pour une faible erreur dans la mesure du volume globulaire.

2° Les solutions soi-disant isotoniques sont en réalité hypotoniques car, même avec NaCl, il y a de grandes divergences de vue.

Considérant comme isotonique une solution de NaCl, les divers auteurs évaluent une telle solution de 7 à 11 grammes de NaCl par litre. En outre, une solution de même Δ que le plasma n'est pas isotonique pour les globules rouges, la qualité des sels intervient, certains ions passent du plasma vers les globules ou inversement. La répartition finale en est régie par loi de Donnan.

Christensen et Warburg [27] ont étudié la composition d'une solution isotonique avec les globules Ils ont démontré que des solutions de sels tels qu'oxalate ou citrate au même Δ que le sérum ne sont pas isotoniques, car les globules rouges mis en suspension dans de telles solutions changent de volume. Pour la solution de citrate à 3 p. 1.000, la contraction globulaire atteint 10 p. 100 du volume initial, pour la solution d'oxalate à 1,3 p. 100 elle est de 4 p. 100. Les auteurs indiquent que la principale cause d'erreur est le changement de pH du sang par départ de l'acide carbonique. Il n'est ni nécessaire, ni suffisant, d'après ces auteurs, que la solution soit de même Δ que le sérum, mais il faut qu'elle soit tamponnée pour éviter les modifications du pH du sang *in vitro*.

Aucun fait précis ne nous permet donc d'admettre le passage des protéides du plasma vers les globules ou inversement.

Application des données ci-dessus établies aux dosages des protéides du plasma.

L'addition au sang d'anticoagulants en poudre pour le dosage des protéides du plasma est de pratique courante dans les laboratoires, et l'on peut citer par dizaines les travaux où cette technique est utilisée. Tous ces dosages sont plus ou moins entachés d'erreur. Les résultats varient d'une espèce animale à l'autre, et dans une même espèce d'un animal à l'autre et pour le même animal, suivant l'état physiologique dans lequel il se trouve. Ils varient aussi suivant l'anticoagulant employé : l'erreur peut être faible avec les anticoagulants puissants qui agissent à très petites doses, elles deviennent importantes avec le citrate de soude, et encore plus avec l'oxalate de potassium ou le fluorure de sodium qui agissent à doses relativement élevées.

Certains auteurs américains [126] ont remarqué l'inexactitude des dosages de protéides pratiqués sur le sang additionné d'anticoagulants en poudre. Mais sans étudier en détail les causes de cette incorrection, ils ont essayé d'y remédier en utilisant les anticoagulants en solution hypertonique (citrate de Na saturé), méthode qui n'est pas plus exacte. Ils se contentent de ces chiffres d'autant plus qu'ils admettent, d'après les travaux de Scott, de Bellis et Scott et de Lehman et Scott, le passage réversible des protéides du plasma vers les globules sous l'influence de la variation de tonicité du milieu.

D'après tout ce qui a été exposé ici, il ressort qu'il est nécessaire de modifier les méthodes courantes de dosage des protéides du plasma suivant les règles suivantes :

1° Le procédé le meilleur est sans aucun doute de pratiquer le dosage des protéides du plasma avec du sang non traité par un anticoagulant. Mais la récolte de plasma frais présente des difficultés techniques parfois insurmontables avec le sang de la plupart des mammifères, qui se coagule rapidement. Elles augmentent parfois encore s'il s'agit de sang pathologique.

2° Pour évaluer la quantité de protéide par unité de volume de plasma, on peut se servir de l'héparine en dilution de 0,75 p. 100 à 2,5 p. 100 qui ne donne pas d'erreur appréciable, au moins pour le sang de lapin. Il sufit d'ajouter 0 c. c. 1 ou 0 c. c. 2 pour 10 cent. cubes de sang. Cependant, ocmme nous le savons par les travaux de Fischer, l'héparine, en modifiant le point iso-électrique des protéides, fausse tous les résultats dans les séparations qu'on utilise couramment au laboratoire pour obtenir les globulines ou différentes fractions globuliniques des albumines.

Les dosages du plasma frais ou du plasma hépariné permettent d'évaluer la quantité de protéines par unité de volume du plasma.

3° Les résultats obtenus par le dosage des protéides d'un plasma additionné d'anticoagulant en poudre ou en solution ne s'appliquent exactement qu'au volume du sang total. A cet effet, on mesure le volume globulaire quand on emploie l'hématocrite pour obtenir des résultats corrects ; il faut régler une fois pour toutes et maintenir constants à la fois le temps et la vitesse de centrifugation. Ayant obtenu la valeur relative du plasma par rapport aux globules, on multiplie celle-ci par la quantité de protéides trouvés dans 1 cent. cube. Si l'on a opéré avec un anticoagulant en solution, il faut évidemment apporter dans le calcul la correction qui convient pour le surplus du volume ajouté. L'erreur d'expérience est tout au plus de 1 à 2 p. 100.

Les dosages pratiqués avec les deux premières méthodes permettent d'évaluer directement la quantité de protéides contenues dans l'unité de volume du plasma.

Par la troisième nous ne mesurons plus les protéides par unité de volume du plasma, mais nous reportons le résultat sur le volume du sang total. Au point de vue physiologique, il est au moins aussi important de connaître la valeur des protéides dans le sang que dans une unité de volume du plasma.

DEUX CAS D'ONYCHOMYCOSE HUMAINE DUS, L'UN AU *TRICHOPHYTON ACUMINATUM*, VAR. *PILOSUM*, L'AUTRE A L'*HEMISPORA STELLATA* VUILLEMIN

par A. et R. SARTORY et J. MEYER.

(Laboratoire de Bactériologie et Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.)

Nous nous proposons, dans ce travail, d'exposer deux cas d'*onychomycose* : le premier, observé chez un homme et dû à l'*Hemispora stellata* Vuillemin ; le deuxième, rencontré chez une femme et causé par le *Trichophyton acuminatum*, variété *pilosum* Sabouraud.

Premier cas. — *Observation clinique du malade :* Le sujet, âgé de trente-six ans, est employé de chemin de fer et travaille comme magasinier dans les dépôts de marchandises ; il fait des travaux de comptabilité, mais aide souvent au déchargement des wagons ou au déplacement des colis ; il est de taille moyenne ; le cœur, les poumons et les reins semblent tout à fait normaux. Les antécédents héréditaires et personnels n'offrent aucune particularité.

L'affection unguéale semble provenir d'un accident survenu huit mois avant : coup de marteau sur l'articulation entre la phalangine et la phalangette de l'index gauche. Pendant plusieurs heures, le doigt resta engourdi ; la blessure saigna quelque peu et, au bout de deux ou trois jours, les choses rentrèrent dans l'ordre. Trois semaines après, il se forme, au niveau de la lésion, un bouton qui prend la taille d'un petit pois, rougit et se propage vers la racine de l'ongle ; à l'aide d'une aiguille, le malade perça ce bouton ; il s'écoula un peu de sang et du pus ; puis le nodule diminua et la peau redevint normale. Deux mois plus tard, l'ongle s'épaissit et montre divers points jaunâtres.

Au premier examen, l'index et le médius de la main gauche sont infectés ; nous notons l'aspect macroscopique suivant :

Index profondément modifié ; couche externe de l'ongle ayant complètement disparu ; surface de l'ongle prenant un aspect gris jaunâtre, fortement verruqueux, pulvérulent ; le scalpel détache facilement la matière unguéale en petites écailles grisâtres, amorphes. La longueur de l'ongle est fortement réduite, atrophique et le lit unguéal se laisse facilement dénuder.

Médius moins lésé ; l'infection a atteint la surface extérieure de

l'ongle, vers le bord droit de la racine ; le reste de la table externe est resté dur et présente un aspect gris opaque, fortement épaissi (environ trois fois la profondeur normale). Des sillons transversaux et sensiblement parallèles donnent à l'ongle la forme d'une râpe. Le bord libre est très dur, corné ; les prélèvements sont difficiles. Dans les couches cornées profondes, on aperçoit des micro-abcès jaunâtres qui permettent l'isolement et la mise en évidence du parasite.

De tout ceci il faut retenir que le médius nous donne la forme jeune, aiguë, évolutive de l'infection, tandis que l'index a atteint le dernier stade de la maladie, caractérisé par l'atrophie et l'exfoliation complète de l'ongle. Les parties de la peau environnantes ne présentent aucun symptôme inflammatoire.

Le premier prélèvement qui nous a été fourni par le médecin traitant, ne nous a pas permis d'isoler le parasite. Le traitement par la chrysarobine iodée est resté sans résultat, c'est alors que le médecin a eu recours à l'extirpation chirurgicale complète des deux ongles et à l'application sur les lésions de teinture d'iode. Les nouveaux ongles présentèrent les mêmes lésions, d'où récidive nette.

A l'aide du matériel prélevé pour la seconde fois nous sommes arrivés à caractériser le parasite au moyen de techniques délicates, de coupes histologiques, de procédés de ramollissement, de microcultures en gélose.

Examen histologique.

On aperçoit dans le « stratum corneum » de petits nodules vacuolaires toujours plus ou moins sphériques. Les cellules cornées de l'épithélium unguéal ont disparu au centre de la lésion et tout autour de ces foyers microscopiques, on note un tissu lardacé, de disposition irrégulière ; les nodules sont localisés vers les parties médianes et profondes de l'ongle. La pulpe des doigts et l'eponychium sont complètement dépourvus de ces foyers d'infection. Le « stratum germinativum », par contre, présente les mêmes formes nodulaires. On y constate des fibres élastiques plus ou moins dégénérées avec une abondance de macrophages et de polynucléaires. Il s'agit donc de micro-abcès de suppuration strictement localisés dans le tissu unguéal même; l'épiderme est absolument indemne

Etude morphologique des prélèvements.

Par la méthode de Gram appliquée aux coupes on a décelé de rares foyers nodulaires dans la zone interne desquels on remarquait une agglomération plus ou moins compacte de corpuscules mycosiques de 2 à 5 μ de diamètre, sphériques ou polymorphes, à membrane épaissie, fortement Gram-positifs ;

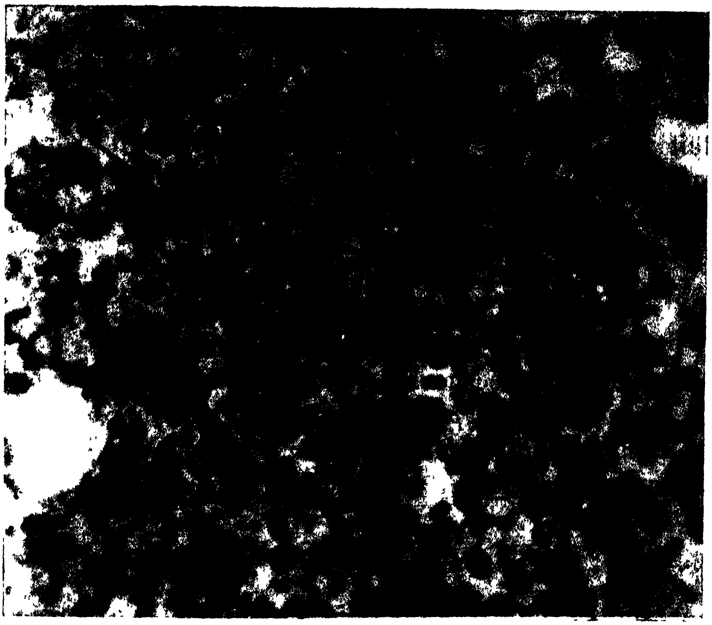


Fig. 1. — Préparation microscopique au moyen de prélèvement d'ongle. Traitement préalable à l'aide du liquide fixateur : alcool-éther-formol-acide, puis coloration au Gram. Gross. : 550 ×. Corpuscules mycosiques composés d'éléments sphériques ou polymorphes, réunis dans les foyers nodulaires.

quelques-uns de ces éléments présentent un protoplasme très granuleux, d'autres montrent un centre hyalin, réfringent, difficilement colorable (fig. 1).

Cultures.

L'organisme pousse particulièrement bien sur milieu de Sabouraud maltosé ; la concentration optimum en ions H est

atteinte pour un pH compris entre 6,8 et 7,0 ; la température optimum est située à + 27°. L'organisme ne pousse plus aux températures supérieures à + 40°. Le maltose semble bien être le sucre le mieux assimilé par notre champignon, qui utilise cependant aussi bien le glucose, le galactose, le saccharose ; par contre, non-utilisation du lactose et du lévulose. Il faut noter ici que l'assimilation des sucres aboutit à une acidification nette des milieux de culture sans dégagement de gaz. En anaérobiose, croissance chétive, les nitrates alcalins sont réduits en nitrites avec un faible dégagement d'azote libre. Notre organisme est aérobie strict, mais un séjour de trois semaines dans un vide poussé n'inhibe pas sa vitalité. Il ne réduit pas le rouge neutre et ne dégage pas d'hydrogène sulfuré à partir des milieux spéciaux. La tryptase est le seul ferment protéolytique qu'il sécrète ; absence de gélatinase, présure et caséase.

Identification du parasite.

Une étude détaillée nous a permis de classer cet organisme dans le groupe des *Hyphomycètes* et de l'identifier à l'*Hemispora stellata Vuillemin* 1906, dont il possède les caractères botaniques, biologiques, culturaux et biochimiques.

Réactions sérologiques.

La sporo-agglutination de Widal et Abrami, au moyen du sérum du malade est positive vis-à-vis de l'*Hemispora stellata* et du *Rhinocladium* (*Sporotrichum*) Beurmanni.

La réaction de déviation du complément pratiquée avec le sérum du malade est strictement spécifique pour l'antigène hémisporique et donne constamment un résultat négatif pour les antigènes d'autres organismes parasitaires expérimentés. Cette épreuve faite au moyen d'antigènes soigneusement préparés et titrés est plus sensible que la sporo-agglutination et permet le diagnostic différentiel. La cuti-réaction chez le malade à l'aide d'un autolysat hémisporique est négative et prouve l'absence de symptômes allergiques chez notre malade dépourvu de dermite profonde.

ACTION PATHOGÈNE EXPÉRIMENTALE.

La virulence de l'espèce envisagée est peu prononcée, mais l'injection sous-cutanée a occasionné chez le cobaye la formation d'abcès suppurés d'une gravité assez marquée et l'homologie stricte des éléments parasitaires rencontrés *in situ* chez



FIG. 2. — Microphoto d une préparation sur lame-gélosée montrant un foyer unguéal d'*Hemispora stellata*, soumis à l'action de l'acide sulfurique. Spores en voies de germination *in situ*. Coloration au Pappenheim. Gross. : 319 ×.

l'homme et chez les animaux a été démontrée. Les rétrocultures à partir des lésions animales ont été réalisées.

La guérison définitive a été obtenue au moyen d'une nouvelle médication par voie intraveineuse à base de glycocollate de cuivre à raison de 10 injections pratiquées à un jour d'intervalle. Le produit contient 0 gr. 18 de sel cuivrique, soit 0 gr. 05 de cuivre métallique.

Le malade n'a présenté aucun symptôme d'intoxication ni d'intolérance.

DEUXIÈME CAS. — *Observation clinique :* La malade, âgée de quarante-deux ans, exerce le métier de femme de chambre chez des industriels vivant dans des conditions d'aisance très bonnes. L'infection siège sur les ongles du petit doigt et du médius de la main droite. Elle n'offre aucun antécédent intéressant.

L'affection unguéale remonte à plus de deux ans ; la malade déclare qu'elle observa, au début, l'apparition de petites taches jaunâtres sur le tiers antérieur de l'ongle du petit doigt ; la lunule et la partie postérieure de cet ongle sont restées longtemps sans manifestation infectieuse. Peu à peu, des matières cornées se sont développées sous l'ongle. Le bord libre a été un peu surélevé et, malgré des soins journaliers, l'extrémité libre a pris un aspect jaune sale. Actuellement, l'ongle du médius est également atteint ; là, les lésions sont localisées à la partie postérieure, en direction de la racine de l'ongle ; de petites taches jaunes sont visibles. Les deux lames unguéales sont fortement épaissies, recourbées irrégulièrement, grumeleuses, rongées superficiellement. Le bord libre de l'ongle du petit doigt est épaissi et surélevé par une sorte de coussinet spongieux ; le bord s'élimine spontanément par petites écailles.

La malade se rappelle avoir soigné un chien qui, périodiquement, perdait ses ongles ; par la suite, l'examen des ongles de l'animal nous a permis de constater le même agent trichophytique observé chez la malade. Nul doute qu'il s'agisse ici d'une contamination de la malade par le chien.

EXAMEN HISTOLOGIQUE.

A l'examen histologique, au moyen de coupes pratiquées dans les prélèvements de l'ongle, on put déceler deux sortes de foyers.

En premier lieu, dans le « stratum corneum », on trouva des lésions isolées, plus ou moins sphériques en forme de petites cavités montrant la dissémination irrégulière de spores jeunes; le tissu unguéal périphérique est fortement modifié et en disposition irrégulière ; au centre des nodules se trouvent des amas de spores, le plus souvent disposées en courtes chaînettes [2-4-6 éléments] (fig. 3).

Dans les mêmes couches histologiques nous percevons des foyers à aspect totalement différent. La disposition du « stratum corneum » est peu altérée, mais entre les cellules kératinisées, nous voyons des foyers mycosiques cylindriques très allongés. Ces lésions renferment des articles plus ou moins longs de filaments agminés très compacts. Par décapage à la potasse, on constate la présence de filaments rubanés, réunis côte à côte en faisceau rectiligne ; les articles sporulaires sont fortement cohérents ; les spores examinées isolément sont sphé

riques ou ovalaires. Leur contenu protoplasmique est très condensé et montre par la coloration de May-Grunwald-Giemsa la présence de granulations basophiles ; la membrane est très épaissie et renferme des dépôts cellulosiques décelables par le rouge Congo (fig. 4).

Dans de rares foyers superficiels on perçoit des rudiments de réseaux filamenteux formés par un mycélium fortement cloi-



Fig. 3. — Microphoto d'une préparation montrant un foyer ungueal de *Trichophyton acuminatum pilosum*, isolé en forme de nodule sphérique, renfermant des spores isolées. Gross . 260 ×.

sonné et anastomosé, à articles rectangulaires ou carrés, se disloquant facilement par pression sur la lamelle ou par traitement à la potasse.

Isolement du parasite. Cultures.

L'isolement de l'agent pathogène a été réalisé par la culture sur milieu de Sabouraud glucosé et par la microculture sur lame gélosée après traitement du matériel unguéal par l'acide

sulfurique à 4 p. 100 (fig. 5). L'organisme pousse particulièrement bien sur gélose glucosée de Sabouraud, sur milieu glucosé ou saccharosé à base d'asparagine ; la concentration en ions H du milieu le plus favorable est réalisée pour les pH compris entre 6,5 et 6,8 ; la température optimum est située à +22° ; la température supérieure, limite de croissance, est de + 37°.

Le sucre le mieux assimilé est le glucose ; cependant. l'assimilation est encore très favorable pour le galactose, le saccharose et le lactose ; le maltose et le lévulose constituent des aliments médiocres ou très médiocres ; la glycérine n'est pas utilisée. L'assimilation des sucres aboutit à une acidification des milieux sans dégagement gazeux.

L'aliment azoté de choix est la peptone granulée de Chassaing ; toutefois, l'asparagine employée à la dose de 2 grammes pour 1.000 fournit des cultures comparables et dont l'aspect microscopique est absolument identique à celui du parasite cultivé sur milieu de Sabouraud type.

La constante minérale d'un milieu optimum pour la croissance de l'organisme en étude peut être exprimée par la formule suivante :

Phosphate monopotassique	1
Chlorure de calcium	0.10
Sulfate de magnésie	0.50
Silicate de potasse	0.30
Eau distillée Q. S. pour	1.000

Le sodium inhibe en général le développement du champignon ; le silicate est nécessaire pour obtenir une récolte maximum.

Examen microscopique en cultures.

Nous avons constaté la présence, dans nos préparations, de thyrses (1 à 2 μ). De plus, certains appareils prennent la forme « Acladium »; ils sont massués, terminaux ou latéraux, cloisonnés, remplis irrégulièrement de protoplasme concentré, munis de spores externes en nombre réduit (1 μ 5 sur 3 à 5 μ). On voit des ébauches de forme sporifère caractérisées par la présence de squelettes ou d'armatures de grappes, restant presque entièrement stériles. On note l'apparition de vrilles

dans les premières cultures obtenues à partir des prélèvements unguéaux. De plus, il y a formation de terminaisons mycéliennes fuselées, pauci-loculaires, de structure simple et uniforme. Des chlamydospores terminales en fuseaux pluriseptés (5 à 10 μ sur 6 à 15 μ) sont visibles. Par contre, il y a absence de fuseaux nettement différenciés, de grappes fertiles, de vrilles et d'appareil reproducteur sexué dans les cultures à



Fig. 4. — Microphoto d'une lésion profonde dans le tissu unguéal trichophytique, montrant la disposition typique du parasite à filaments parallèles et spores en chapelets. Gross. : 247 ×.

caractères morphologiques définitivement fixés sur milieu de Sabouraud d'épreuve où sucré ; il nous a été impossible d'observer et de reproduire des phénomènes de pléomorphisme au cours des cultures (fig. 6)

Caractères macroscopiques des cultures sur milieu de Sabouraud.

Colonies caractérisées par une acumination centrale, couronnée de quatre ou cinq petites excroissances barbues, par

leurs contours extérieurs polygonaux au début, devenant circulaires lorsque la culture a pris son complet développement, par la surface mamelonnée et leurs bords godronnés, par leur duvet court et dense comme du velours, blanchâtre, couvrant les colonies adultes.

Les rétrocultures à partir de prélèvements de lésions réalisées chez le cobaye nous ont toujours fourni l'organisme type, prouvant la pathogénéité de notre agent d'onychose.



FIG. 5. — Microphoto d'une préparation sur lame-gélosée montrant un foyer unguéal trichophytique, après traitement à l'acide sulfurique. Spores en voie de germination *in situ*. Gross. : 429 ×.

IDENTIFICATION DU PARASITE.

L'étude détaillée des caractères botaniques, biologiques, culturaux et biochimiques de notre champignon nous a permis de l'identifier au *Trichophyton acuminatum*, variété *pilosum*, Sabouraud, 1909.

RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

Nous avons tenu à contrôler notre diagnostic anatomo-patho-

logique et cultural par des réactions de séro-diagnostic qui nous permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° D'une manière générale, absence d'anticorps décelables par la méthode de déviation du complément au moyen de la technique au sérum chauffé et par la méthode de séro-diagnostic de Widal et Abrami au moyen du procédé de l'agglutination.

2° Dans certains cas et à certaines périodes, présence d'anti-



FIG. 6. — Microphoto d'une culture du *Trichophyton*, montrant l'aspect morphologique du champignon à propriétés culturales définitivement fixées. Gross. : 429 ×.

corps trichophytiques décelables par la méthode de déviation du complément au moyen de la technique au sérum non chauffé.

3° Après vaccination et traitement à l'aide de trichophytine, d'une manière générale, apparition d'anticorps spécifiques dans le sérum de la malade.

4° La cuti-réaction chez la malade, à l'aide d'autolysats

trichophytiques est négative et prouve l'absence de symptômes allergiques chez cette femme ne présentant pas de dermite profonde.

THÉRAPEUTIQUE.

Les interventions chirurgicales (avulsions), le traitement aux rayons X, les applications locales de produits à base d'iode et de chrysarobine, les médicaments iodés par voie interne, les arsenicaux tels que le tréparsol ou le novarsénobenzol ne donnèrent aucun résultat.

Par contre, la guérison définitive de l'onychomycose a été obtenue au moyen de la médication au glycocollate de cuivre, à raison de 12 injections pratiquées à un jour d'intervalle chacune avec un produit contenant 5 centigr. 18 de sel cuivrique ou 0 gr. 05 de cuivre métallique. Le traitement a été précédé d'une application de rayons X occasionnant l'élimination complète des deux ongles malades.

La malade n'a présenté aucun symptôme d'intoxication, ni d'intolérance vis-à-vis de ce traitement.

VIRULENCE
DES TROIS TYPES DE BACILLES TUBERCULEUX
POUR LA SOURIS BLANCHE

par

N. STAMATIN, et Mme L. STAMATIN,

Chef des travaux à l'Institut Pasteur de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest.

Assistante à la Chaire des maladies contagieuses de la Faculté de Medecine Vetérinaire de Bucarest.

(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose)

C'est Robert Koch qui, en 1884, constata le premier que la souris est très résistante à l'infection tuberculeuse : l'inoculation sous-cutanée ne provoque qu'exceptionnellement l'infection, même quand on utilise de fortes doses ; par contre, l'inoculation intrapéritonéale détermine une tuberculose évolutive. mortelle. Cette résistance de la souris blanche à l'infection bacillaire a été confirmée par A. S. Griffith, A. Boquet et L. Nègre. I. Straus réussit à infecter plus régulièrement la souris par la voie sous-cutanée, mais il n'obtint pas de lésions nodulaires dans les poumons.

Il semble que les souris puissent être infectées par ingestion (L. Cobbett, Weber et Bofinger, A. Boquet et L. Nègre), ainsi que par inhalation (H. Schwabacher et G. S. Wilson) Mais c'est la voie intrapéritonéale et surtout la voie intraveineuse qui offrent les plus grandes garanties. La voie cérébro-spinale permet aussi, d'après A. W. Sellards et H. Finkstone, l'infection bacillaire de la souris blanche. R. Béquignon a également obtenu une tuberculose pulmonaire évolutive, chez le même animal, par inoculation intracérébrale.

Les souches atténuées comme le BCG (Strempel) ne provoquent pas la formation de lésions par ces mêmes voies. Les

souches de laboratoire qui conservent une certaine virulence pour le cobaye et le lapin se montrent parfois très peu pathogènes pour la souris (Bruno Lange, J. Valtis). Les souches récemment isolées sont plus actives.

La dose de bacilles inoculée doit être assez forte. Römer, en inoculant par voie intrapéritonéale la dose de 10 milligrammes de bacilles bovins, obtient la mort de la souris en six à neuf jours ; la dose de 2 milligr. 5 par la même voie tue en quatre semaines. H. Schwabacher et G. S. Wilson affirment que seulement les doses de 100, 10 ou 1 million de bacilles humains ou bovins peuvent tuer la souris en un délai variant de un à quatre mois ; les doses de 100.000, 10.000 ou 1 000 bacilles n'amènent la mort qu'après quatre mois.

Les travaux de Trommsdorff, Peter, Weber, W. Binder, qui admettaient que les souches bovines sont beaucoup plus virulentes que les souches humaines pour la souris n'ont pas été confirmés. Si B. Lange, C. Browning et R Gulbrausen ont constaté une certaine différence, celle-ci n'est pas assez prononcée pour permettre de distinguer les deux types

Le bacille aviaire, d'après Cobbett, serait le plus virulent. C'est le seul type qui ait été rencontré comme agent de la tuberculose spontanée chez la souris grise (de Jong, M. Koch et L. Rabinowitsch, A. Hemmert-Halswick). A. Saenz et L. Costil ont constaté que les variantes R du bacille aviaire ne sont plus virulentes pour la souris tandis que les variantes S correspondantes sont encore pathogènes.

Tous les auteurs qui ont étudié l'infection bacillaire chez les souris ont signalé que les organes de ces animaux porteurs de lésions tuberculeuses contiennent un très grand nombre de bacilles.

La souris est très peu sensible à l'action toxique du bacille de Koch ; elle ne réagit pas à la tuberculine (Römer, A. Boquet et L. Nègre, Bruno Lange).

Il semble que la souris grise soit plus réceptive à la tuberculose que la souris blanche (R. Koch et I. Straus). Parmi les autres rongeurs, le rat offre le même degré de réceptivité que la souris (I. Straus, A. S. Griffith, A. Boquet et L. Nègre).

*
* *

En reprenant l'étude de l'infection tuberculeuse expérimentale chez la souris blanche, nous avons poursuivi un double but : vérifier si la souris se prête au titrage de la virulence des souches appartenant au même type bacillaire et à la détermination du type auquel une souche appartient.

A cet effet, nous avons utilisé des souches récemment isolées. Parallèlement on a inoculé, en vue de déterminer la virulence et le type de chaque souche, des lapins pour les souches présumées bovines, des cobayes pour les souches présumées humaines et des lapins et des poules pour les souches présumées aviaires. L'inoculation à la souris a été effectuée par voie veineuse, et, dans certains cas, par voie péritonéale, sous le volume constant de 0 cent. cube 2 de suspension virulente. Des doses de 1 milligramme de bacilles en suspension dans ce volume d'eau physiologique peuvent provoquer chez la souris, lors de l'inoculation intraveineuse, la mort immédiate, tandis que les doses inférieures sont parfaitement supportées.

On a donné la préférence aux cultures jeunes sur milieu à l'œuf.

Le type humain.

Nous avons employé, au cours de nos recherches, 10 souches humaines ainsi que 9 variantes qui ont été obtenues, par le procédé que nous avons déjà décrit (1), d'une partie de ces 10 souches. En même temps, pour une grande partie de ces souches, nous avons inoculé des cobayes. Les souches utilisées présentaient des degrés de virulence très variables pour ces animaux, ce qui, d'ailleurs, correspondait à l'objet même de nos recherches sur la souris.

La souche 175 P (2) fut isolée le 20 décembre 1937 ; inoculée au cobaye

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1573.

(2) La plus grande partie des souches humaines que nous avons employées dans ces expériences ont été aimablement mises à notre disposition par M. R. Laporte ; nous lui en exprimons nos plus vifs remerciements.

par voie sous-cutanée à la dose de 10^{-4} et 10^{-6} milligramme, elle provoque une tuberculose massive en quatre-vingts jours.

La souche 175 F dérive de la précédente. Le 9 novembre 1938, on a inoculé 2 cobayes à la dose de 10^{-4} milligramme et 2 à la dose de 10^{-6}, par voie sous-cutanée. Les animaux, sacrifiés au bout de quatre-vingts jours, présentaient des lésions tuberculeuses massives.

La souche H 1 P, isolée le 18 mars 1938, fut inoculée à 2 cobayes à la dose de 10^{-5} milligramme et 2 autres à la dose de 10^{-6} milligramme par voie dermique. Les animaux, sacrifiés au bout de quatre-vingt-dix jours, présentaient des lésions localisées aux poumons et à la rate ; les ganglions correspondants étaient hypertrophiés et caséeux.

La souche H 1 F, dérivée de la précédente le 4 juin 1938, fut inoculée au même nombre d'animaux, à la même dose et par la même voie que la souche H 1 P. Les lésions, au bout de quatre-vingt-dix jours, consistaient dans la caséification des ganglions efférents et dans la présence de nodules isolés dans la rate et les poumons.

La souche H 5 P, isolée le 23 mai 1938, fut inoculée au cobaye à la dose de 10^{-5} milligramme (2 cobayes) et à la dose de 10^{-6} milligramme (2 cobayes) par voie dermique. Un cobaye inoculé à la dose de 10^{-5} milligramme est mort après cinquante-deux jours ; il présentait des ganglions afférents caséeux et quelques nodules dans la rate et les poumons. L'autre fut sacrifié au bout de quatre-vingts jours ; il avait des lésions de tuberculose très avancées. Un des cobayes inoculés à la dose de 10^{-6} est mort au bout de cinquante-six jours, sans lésions ; l'autre fut sacrifié au bout de quatre-vingt-trois jours ; il était porteur de ganglions caséeux, de nombreux nodules de la rate et de quelques tubercules dans les poumons.

La souche H 5 F, dérivée de la précédente le 17 août 1938, fut inoculée à 3 cobayes à la dose de 10^{-5} milligramme et à 3 autres cobayes à la dose de 10^{-6} par voie dermique. Un des trois premiers cobayes est mort après cinquante-deux jours avec les ganglions efférents caséifiés, des nodules nombreux dans la rate, moins nombreux dans les poumons ; les deux autres furent sacrifiés au bout de quatre-vingts jours , ils présentaient des lésions tuberculeuses très avancées. Les cobayes inoculés à la dose de 10^{-6} milligramme furent sacrifiés au bout de quatre-vingt-deux jours ; ils avaient des lésions ganglionnaires et d'assez nombreux nodules dans la rate et les poumons.

La souche 180 P, isolée le 10 janvier 1938, fut inoculée à 2 cobayes à la dose de 10^{-2} milligramme et à 2 cobayes à la dose de 10^{-6} milligramme par voie dermique ; tous furent sacrifiés au bout de quatre-vingts jours. Un des cobayes inoculés à la dose de 10^{-2} milligramme avait une tuberculose généralisée ; l'autre, seulement des lésions ganglionnaires. Les cobayes inoculés à la dose de 10^{-6} milligramme présentaient des ganglions correspondants caséifiés et des nodules épars dans la rate et les poumons.

La souche 180 F, dérivée de la précédente le 10 juin 1938, fut inoculée à la dose de 10^{-2} milligramme et 10^{-6} milligramme par voie dermique, à raison de 2 cobayes par dose ; sacrifiés au bout de quatre-vingts jours, ils furent trouvés indemnes de toute lésion tuberculeuse.

La souche 195 P, isolée le 10 novembre 1938, fut inoculée à la dose de 10^{-2} milligramme et de 10^{-6} milligramme par voie dermique. Un des 2 cobayes inoculés à la dose de 10^{-2} milligramme est mort

après vingt-neuf jours ; il avait, pour toutes lésions, un abcès local et les ganglions correspondants hypertrophiés ; la rate et les poumons étaient sains. L'autre cobaye fut sacrifié au bout de quatre-vingts jours : il était atteint de lésions tuberculeuses massives ; les 3 cobayes inoculés à la dose de 10^{-6} milligramme furent sacrifiés au bout de quatre-vingts jours ; tous présentaient des ganglions caséeux et des nodules épars dans la rate et les poumons.

Les souches 195 F_1, F_2 et F_3, dérivées de la précédente le 23 mai 1938 furent inoculées à des cobayes à la dose de 10^{-6} milligramme par voie dermique ; les cobayes inoculés avec la souche 195 F_1 ont été sacrifiés quatre-vingts jours plus tard ; ils n'avaient aucune lésion tuberculeuse. Les cobayes inoculés avec les variantes 195 F_2 et 195 F_3 ont été sacrifiés le soixante-dixième jour. Leurs ganglions étaient hypertrophiés, mais la rate, le foie et les poumons ne contenaient aucune lésion.

La souche 220 P, isolée le 31 mars 1938, fut inoculée par voie dermique à la dose de 10^{-5} milligramme à 2 cobayes et à la dose de 10^{-6} milligramme à 2 autres cobayes. Les premiers, sacrifiés au bout de quatre-vingt-dix jours, étaient atteints de tuberculose généralisée ; les derniers sont morts quarante-trois jours après d'une maladie intercurrente ; on a trouvé chez ces animaux une hypertrophie ganglionnaire et quelques nodules dans la rate.

La souche 220 F, dérivée de la précédente le 8 août 1938, fut inoculée à la dose de 10^{-5} milligramme à 2 cobayes et à la dose de 10^{-6} à 2 autres cobayes par voie dermique. Les premiers, sacrifiés au bout de quatre-vingt-dix jours, ont présenté une tuberculose généralisée. Un des derniers est mort après soixante-cinq jours ; à l'autopsie on trouva les ganglions efférents caséifiés et de rares nodules dans les poumons.

INOCULATIONS PAR VOIE VEINEUSE CHEZ LA SOURIS. — 19 cultures humaines ont été inoculées à des souris à doses variables. Le tableau I donne en partie les résultats de ces inoculations. A la dose de 1 milligramme, on a inoculé 2 souches à 6 souris. Ces animaux sont morts très vite — treize à vingt-six jours, en moyenne vingt jours — avec des lésions massives. Dans les organes, le nombre des bacilles était toujours très élevé

A la dose de 0 milligr. 1, on a inoculé d'une part 14 souches qui étaient virulentes pour le cobaye, d'autre part 4 souches dépourvues de virulence pour le même animal. Les 14 premières souches ont tué toutes les souris inoculées. La durée de la maladie varia dans des limites assez larges, entre onze et quatre-vingt-dix-sept jours. Les lésions étaient toujours très étendues et le nombre de bacilles dans les organes — poumons, rate, foie — en règle générale, assez grand.

Quant aux 4 souches qui s'étaient montrées avirulentes pour le cobaye, elles le furent aussi pour la souris.

Tableau I. — **Virulence des souches humaines pour la souris blanche (voie intraveineuse).**

Dose inoculée en milligramme	Numéro de la souche	Nombre de souris inoculées par souche	Durée de la survie en jours	Intensité des lésions	Abondance des bacilles dans les organes
0,1	175 P	4	34 69 91 97	+++ P +++ P +++ P +++ P	++ ++ +++ ++
	175 F	4	20 22 26 27	+++ +++ +++ +++ P	+++ +++ +++ +++
	195 P	4	22 22 37 57	+++ P +++ P +++ P +++ P	+++ +++ + +++
	195 F	4	120 × 120 × 120 × 120 ×	— + + +	— — + —
	180 P	4	30 34 35 49	+++ P +++ P +++ P +++ P	+++ +++ +++ +++
	180 F	3	90 × 90 × 90 ×	— — —	— — —
	H5 P	3	22 27 35	+ +++ +++	+ +++ +++
	H5 F	3	21 27 48	+ +++ +++ P	+ +++ +++
	H1 P	4	39 44 61 62	+++ P +++ P +++ P +++ P	+ ++ +++ ++
	H1 F	4	16 19 19 26	+++ P +++ P +++ P +++ P	+++ +++ +++ +++
	220 P	3	28 38 45	+++ P +++ P +++ P	+++ +++ ++
	220 F	3	24 31 44	+++ +++ P +++ P	+++ +++ ++

DOSE inoculée en milligramme	NUMÉRO de la souche	NOMBRE de souris inoculées par souche	DURÉE de la survie en jours	INTENSITÉ des lésions	ABONDANCE des bacilles dans les organes
0,01	177 P	3	20	+	++
			22	+++	+++
			27	+++	+++
	H1 P	4	26	+++	+++
			43	+++	+++
			66	+++ P	+++
			75	+++	+++
	180 P	3	24	+	+
			27	+++	+++
			40	+++	+++
	220 P	3	90	+	+
			104	+++ P	+++
			120	+++ P	+++
0,001	175 P	6	33	—	+
			100	+	+
			125 ×	+	+
			125 ×	+	+
			125 ×	+	+
			141	++	++
	175 F	3	55	+++	++
			85	+	+
			115	+++ P	++
	H1 P	4	57	+++	++
			117	—	—
			129	—	—
			137	+	+
	180 P	4	98	+	+
			104	+++ P	+++
			108	+	+
			138	+	+
	220 P	3	124 ×	—	—
			124 ×	—	+
			124 ×	—	—

—, pas de lésions, pas de bacilles, +, lésions restreintes, nombre de bacilles réduit ; ++, lésions assez développées ; nombre de bacilles dans les organes assez élevé ; +++, lésions de tuberculose massives, très nombreux bacilles dans les organes, ×, souris sacrifiées, P, pneumonie.

En diminuant la dose, la durée de la maladie se prolonge ; c'est ainsi que 13 souris inoculées à la dose de 0 milligr. 01 sont mortes entre le vingtième et le cent vingtième jour. Les lésions étaient moins étendues, mais toutes les souris finissaient par mourir de leur infection. Il en va différemment quand on

diminue encore la dose. Une partie des souris seulement inoculées à la dose de 0 milligr. 001 finirent par mourir, les autres ont dû être sacrifiées. Les lésions constatées chez les unes et chez les autres étaient peu développées ; elles pouvaient rarement être considérées comme responsables de la mort.

Avec la dose de 10^{-5} milligrammes, les lésions provoquées chez la souris ont été minimes et elles n'ont jamais entraîné la mort de l'animal.

Inoculations par voie péritonéale chez la souris. — Il est bien connu que la voie péritonéale permet l'infection tuberculeuse de la souris. Nous avons cherché à préciser la différence qui peut exister entre la durée de la maladie et l'intensité des lésions en employant comparativement la voie veineuse et la voie péritonéale. Nous avons choisi à cet effet la souche 175 F_1, qui tue vite et régulièrement la souris par voie veineuse. On a inoculé à la dose de 0 milligr. 1, d'une part, 4 souris par cette voie, d'autre part 14 souris par voie intrapéritonéale. Les résultats montrent que cette dernière voie est moins favorable à l'infection, car les souris ainsi infectées moururent plus tard et plus irrégulièrement que les souris inoculées par voie veineuse.

Essai de titrage de la virulence des souches humaines chez la souris.

D'une manière générale, on peut affirmer qu'une souche virulente pour le cobaye l'est aussi pour la souris et qu'une souche dépourvue de virulence pour le cobaye l'est aussi pour la souris. Mais si l'on essaie de déterminer avec plus de précision le degré de virulence d'une souche, on constate qu'elle se comporte différemment chez les animaux de ces deux espèces. Si l'on considère, par exemple, les souches 175 P, H1 P et leurs variantes 175 F et H1 F, on note que, pour le cobaye, il n'y a pas de différences de virulence entre les souches originales (175 P ou H1 P) et leur variantes 175 F et H1 F ; mais l'inoculation de ces souches à la souris montre que les variantes sont beaucoup plus virulentes que les souches dont elles dérivent. Ces différences ne sont pas, à notre avis, acciden-

telles ; elles correspondent aux propriétés pathogènes de chaque souche ; les variantes 175 F et H1 F possèdent des facteurs qui les rendent plus virulentes pour la souris que les souches d'origine. Chez le cobaye, on ne peut pas les mettre en évidence, cet animal étant trop sensible, mais chez la souris, qui est beaucoup plus résistante, ces facteurs de virulence peuvent se manifester. La virulence d'un germe est due à un complexe de facteurs : la façon différente de réagir du cobaye et de la souris vis-à-vis de la même souche résulte de la mise en jeu de ces facteurs.

Le type bovin

On a examiné, en ce qui concerne la virulence pour la souris, 10 souches bovines et 2 variantes issues de 2 souches différentes. Toutes les souches, sauf B 14 et B 28, ont été isolées par nous-mêmes de ganglions de bœufs tuberculeux.

Parallèlement aux inoculations aux souris, on a inoculé aussi des lapins par voie veineuse.

La souche B 2, isolée le 10 mars 1937, fut inoculée à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 le 7 août 1938 ; ces 2 animaux sont morts quarante jours après avec des lésions de tuberculose généralisées.

La souche B 14, isolée des ganglions du porc tuberculeux, le 19 novembre 1937, fut inoculée le 12 juillet 1938 à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 ; les lapins moururent respectivement vingt-trois et trente-neuf jours après avec des lésions de tuberculose généralisées.

La souche B 25, isolée le 15 janvier 1938, fut inoculée le 4 juillet 1938 à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 ; 1 lapin est mort d'une maladie intercurrente ; l'autre succomba à la tuberculose vingt-deux jours plus tard.

La souche B 27, isolée le 15 janvier 1938, fut inoculée le 24 novembre 1939 à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 ; ils moururent respectivement dix-neuf et vingt-quatre jours après, avec des lésions massives de tuberculose.

La souche B 28 P, isolée des ganglions d'un porc tuberculeux, le 15 janvier 1938, fut inoculée le 3 novembre 1938 à la dose de 0 milligr. 01 à 1 lapin et à la dose de 0 milligr. 000 01 à 1 autre lapin ; le premier est mort vingt-sept jours après avec des lésions massives de tuberculose ; le deuxième est mort quarante et un jours après ; il présentait, à côté de nombreux tubercules dans les poumons, rate et rein, des lésions de pasteurellose.

La souche B 28 F, dérivée de la précédente le 11 juillet 1938, fut inoculée à 2 lapins dans les mêmes conditions que la souche B 28 P. Le lapin inoculé avec la dose de 0 milligr. 01 mourut quarante-quatre jours après avec des lésions de tuberculose limitées aux poumons ;

l'autre lapin, qui avait reçu la dose de 0 milligr. 000.01, succomba cinquante-six jours après de pasteurellose sans lésions tuberculeuses.

La souche B 30 P, isolée le 21 janvier 1938, fut inoculée à la dose de 0 milligr. 01 à 1 lapin et à la dose de 0 milligr. 000.001 à 1 autre. Ces 2 animaux succombèrent respectivement cinquante-cinq et quatre-vingt-sept jours après avec des lésions de tuberculose généralisées.

La souche B 30 F, dérivée de la précédente le 5 mai 1938, fut inoculée à 2 lapins, 1 à la dose de 0 milligr. 5, l'autre à la dose de 0 milligr. 01 ; le premier fut sacrifié quarante-six jours plus tard ; il ne présentait pas de lésions tuberculeuses ; le deuxième est mort de pasteurellose quatre-vingt-neuf jours plus tard sans présenter, lui non plus, de tuberculose.

La souche B 31, isolée le 21 janvier 1938, fut inoculée à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 le 24 novembre 1939. Un lapin est mort seize jours après avec des lésions de tuberculose et de pasteurellose ; l'autre succomba avec des lésions très avancées de tuberculose, trente-deux jours plus tard.

La souche B 32, isolée le 28 janvier 1938, fut inoculée le 28 novembre 1939 à la dose de 0 milligr. 01 à 2 lapins qui moururent respectivement vingt et vingt-six jours après avec des lésions de tuberculose généralisées.

La souche B 33, isolée le 28 janvier 1939, fut inoculée le 18 novembre 1939 à la dose de 0 milligr. 01 à 2 lapins ; ils moururent respectivement vingt-deux et trente-deux jours après avec des lésions de tuberculose généralisées.

La souche B 34, isolée le 28 janvier 1939, fut inoculée le 24 novembre 1939 à 2 lapins à la dose de 0 milligr. 01 ; 1 lapin mourut trente-six jours après d'une maladie intercurrente sans lésions tuberculeuses ; l'autre fut sacrifié soixante-dix jours aprèss : il présentait des nodules épars dans le tissu pulmonaire sain, un nodule dans le rein. La rate était normale.

INOCULATION PAR VOIE VEINEUSE. — Les doses inoculées par voie veineuse ont varié de 1 milligramme à 0 milligr. 00001. A la dose de 1 milligramme, on a inoculé 3 souches à 6 souris. Celles-ci sont mortes assez rapidement, en neuf à trente-cinq jours, avec des lésions de tuberculose massive, intéressant surtout les poumons. Les lésions pulmonaires étaient très riches en bacilles, celles du foie et de la rate en contenaient moins. Avec la dose de 0 milligr. 1, les résultats, lors de l'inoculation des souches virulentes pour le lapin, ont été assez réguliers (voir le tableau II). On a inoculé 5 souches à 17 souris, qui moururent entre le vingtième et le soixante-dixième jour, avec des lésions qui justifiaient la mort ; le nombre des bacilles était toujours très élevé.

Quant aux souches qui s'étaient montrées avirulentes ou

Tableau II. — **Virulence des souches bovines pour la souris (voie intraveineuse).**

DOSE inoculée en milligramme	NUMÉRO de la souche	NOMBRE de souris inoculées par souche	DURÉE de la survie en jours	INTENSITÉ des lésions	ABONDANCE des bacilles dans les organes
	25	3	20 26 27	+++ +++ +++	+++ +++ +++
	27	3	31 32 35	+++ +++ +++	+++ +++ +++
	32	3	32 33 36	+++ +++ +++	+++ +++ +++
0,1	30 P	4	31 33 37 67	+++ +++ +++ +++ P	+++ ++ ++ ++
	30 F	3	120 × 120 × 120 ×	— — —	— — —
	28 P	4	30 31 32 67	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++
	25 F	4	31 60 70 90 ×	+++ P — + +	++ + + +
	2	3	34 41 44	— ++ ++	+ ++ ++
	30	2	42 54	++ ++	++ ++
	31	2	33 36	++ +++	++ +++
0,01	14	3	31 41 81	+++ +++ P +++ P	+++ +++ +++
	28 P	4	34 36 56 57	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++
	33	4	35 53 98 116	+++ ++ +++ +	+++ + ++ ++
	34	4	24 × 42 × 43 × 49 ×	— + — —	— + + +

DOSE inoculée en milligramme	NUMÉRO de la souche	NOMBRE de souris inoculées par souches	DURÉE de la survie en jours	INTENSITÉ des lésions	ABONDANCE des bacilles dans les organes
0,001	27	3	34 63 123 ×	+++ +++ ++	++ ++ ++
	32	2	61 68	+++ +++	++ +++
	14	4	72 77 79 92	+++ +++ P +++ P ++	+++ +++ ++ ++
	28 P	4	41 62 • 90 × 90 ×	+++ ++ + +	+++ ++ + +
	33	4	46 48 96 105	+++ +++ ++ +++ P	+++ +++ + ++

Même légende que pour le tableau I.

peu virulentes pour le lapin, elles le furent aussi pour la souris

A la dose de 0 milligr. 01, on a inoculé 6 souches à 19 souris ; ces souris sont mortes après un délai variant de treize à cent seize jours.

A la dose de 0 milligr. 00001, on a inoculé 3 souches à 9 souris ; 2 souris sont mortes au bout de vingt et un jours sans présenter de lésions ; 3 souris ont été sacrifiées respectivement après quatre-vingt-dix, quatre-vingt-dix et cent vingt-trois jours ; les autres sont mortes avec des lésions tuberculeuses assez étendues ; le nombre des bacilles dans les organes était assez grand.

A la dose de 0 milligr. 0001, on a inoculé 3 souches à 9 souris ; la majorité des souris ont été sacrifiées au bout de cent vingt-trois jours Les lésions étaient assez restreintes ; de même le nombre des bacilles dans les organes. Chez les souris inoculées avec cette dose, les lésions étaient plus accentuées que celles des souris qui avaient reçu la même dose, mais de souches humaines.

Inoculations par voie intrapéritonéale.

Comme dans les expériences précédentes et afin de comparer la durée de la maladie et les lésions produites par l'inoculation intraveineuse ou intrapéritonéale, on a inoculé 2 souches, à la dose de 0 milligr. 1 aussi, par cette dernière voie.

Les résultats montrent que, pour ce type également, l'infection provoquée par l'inoculation péritonéale évolue beaucoup plus lentement que l'infection provoquée par l'inoculation intraveineuse.

Possibilité de titrage de la virulence des souches bovines chez la souris.

En examinant les tableaux concernant la virulence des souches bovines pour le lapin et pour la souris, on observe qu'il n'y a pas de discordance dans la façon de réagir de ces deux espèces animales. La souris permet de distinguer non seulement une souche virulente d'une souche qui ne l'est pas, mais encore, au contraire de ce qu'on observe pour les souches humaines, on peut même distinguer une souche très virulente d'une autre qui l'est moins. Les résultats sont encore plus nets lorsqu'on inocule des doses différentes de la même souche Nos recherches montrent même que la souris se prête assez bien au titrage de la virulence des souches bovines, si l'on adopte la voie veineuse et si l'on inocule au moins deux doses — 0 milligr. 01 et 0 milligr 001 — à raison de 4 souris par dose.

Le type aviaire.

Pour ce qui concerne le bacille de type aviaire, le nombre des souches employées ainsi que le nombre des souris furent de beaucoup plus faibles ; mais, les résultats ne sont pas moins évidents ; ils nous autorisent à affirmer que le bacille de type aviaire, contrairement aux constatations faites par divers auteurs, est moins pathogène pour la souris, par voie intraveineuse, que les bacilles des mammifères.

Nous avons employé 4 souches isolées par nous de poules tuberculeuses. Ces souches étaient pathogènes, par voie veineuse, pour la poule et le lapin.

La souche Av. 2, isolée le 20 janvier 1938, fut inoculée le 25 novembre 1938 à 1 lapin à la dose de 1 milligr., à une poule à la dose de 0 milligr 01 et à une autre poule à la dose de 0 milligr. 0001 ; le lapin et la première poule sont morts de tuberculose du type Yersin après treize et quarante-huit jours respectivement ; la poule, inoculée à la dose de 0 milligr. 0001, a succombé soixante-quatre jours après avec des nodules tuberculeux dans la rate et le foie.

La souche Av. 3, isolée le 20 janvier 1938, fut inoculée le 17 novembre 1938 aux mêmes doses que la souche Av. 2 à 1 lapin et à 2 poules. Le lapin est mort le dix-huitième jour et la poule, inoculée à la dose de 0 milligr. 01, le trente et unième jour. Les deux animaux présentaient une tuberculose du type Yersin. La poule inoculée à la dose de 0 milligr. 0001 a succombé le quarante-huitième jour avec des lésions nodulaires dans le foie et la rate.

La souche Av. 4, isolée le 27 janvier 1938, fut inoculée le 25 novembre 1938 à 1 lapin et à 2 poules ; le lapin et la poule qui avaient reçu respectivement 1 milligramme et 0 milligr. 01, sont morts quinze et vingt-sept jours après avec des lésions du type Yersin. La poule inoculée à la dose de 0 milligr. 0001 a succombé le quatre-vingt-quinzième jour ; elle présentait de très nombreux nodules dans le foie et la rate

La souche Av. 5, isolée le 27 janvier 1938, fut inoculée dans les mêmes conditions que les souches précédentes. Le lapin, qui avait reçu 1 milligramme, est mort en dix-huit jours de tuberculose du type Yersin ; la poule, qui avait reçu 0 milligr. 01, a succombé le quarantième jour ; quant à la poule qui avait été inoculée à la dose de 0 milligr. 0001, elle est morte soixante-trois jours après avec des lésions de tuberculose chronique très avancées.

Inoculations par voie intraveineuse. — Chez la souris, la virulence de ces souches est très irrégulière. A la dose de 1 milligramme, on a inoculé seulement la souche n° 2 à 4 souris, dont 2 par voie veineuse et 2 par voie intrapéritonéale. Bien que la dose ait été forte, une seule souris est morte au bout de soixante-dix jours, les 3 autres furent sacrifiées au bout de cent vingt jours. Leurs lésions étaient assez peu marquées. Mais elles contenaient des bacilles en très grand nombre. A la dose de 0 milligr. 1, nous avons inoculé les 4 souches à 17 souris qui, pour la plupart, ont succombé à des intervalles très irréguliers. Les lésions étaient plus ou moins étendues, le nombre de bacilles toujours très grand, quelquefois énorme. Chez les souris sacrifiées, et qui ne pré-

Tableau III. — **Virulence des souches aviaires pour la souris (voie intraveineuse).**

DOSE inoculée en milligramme	NUMÉRO de la souche	NOMBRE de souris inoculées par souche	DURÉE de la survie en jours	INTENSITÉ des lésions	ABONDANCE des bacilles dans les organes (poumons, foie, rate)
1	2	4	70	+	+++
			120 ×	+	++
			120 ×	+	++
			120 ×	+	++
0,1	2	4	12	+	++
			28	++	+++
			98	+++	+++
			112 ×	+++	++
	3	3	110	+++	+++
			130	+	+
			136 ×	+++	+
	4	7	15	+	+
			22	++	+++
			27	++	+++
			46	+	++
			55	+	—
			92	++	++
			112	+++	++
	5	3	130	+++	+++
			134 ×	+++	+++
			136	+++	+++
0,01	2	4	117	+++	+++
			117	+++	+++
			11	+	++
			118 ×	+++	+++
	3	3	34	+	+
			136 ×	++	+
			136 ×	++	+
	4	3	12	+	+
			82	++	+++
			88	+++	+++
	5	3	120	+++	+++
			126	—	+
			132 ×	++	+++
0.001	3	3	78	++	+++
			134	+	+
			136 ×	++	+
	4	3	45	+	+
			93	+	—
			101	+	++
	5	3	77	+	++
			136 ×	+++	++
			136 ×	+++	+++

Même légende que pour le tableau 1.

sentaient d'ailleurs aucun signe de maladie, le foie, la rate et les poumons contenaient parfois des masses considérables de bacilles.

A la dose de 0 milligr. 01, les 4 souches furent inoculées à 15 souris par voie veineuse et à 2 souris par voie péritonéale. 13 ont succombé entre le onzième et le cent vingt-sixième jour ; 4 ont été sacrifiées respectivement après cent dix-huit, cent trente-deux, cent trente-six, cent trente-six jours. Les lésions macroscopiques étaient plus ou moins prononcées, mais le nombre des bacilles fut toujours assez élevé. La dose de 0 milligr. 001 a donné presque les mêmes résultats.

La quantité de germes inoculés ne semble pas jouer un grand rôle dans l'évolution de la tuberculose du type aviaire chez la souris. C'est ainsi qu'on ne constate pas de différences importantes quant à la durée de la maladie et à l'intensité des lésions entre les souris inoculées à la dose de 0 milligr. 1 ou de 0 milligr. 001. Mais, au-dessous de cette dernière dose, le bacille aviaire ne provoque plus de lésions. La dose de 0 milligr. 00001 est presque complètement inactive. Sur 9 souris qui avaient reçu cette dose, les organes ne contenaient des bacilles que chez une seule.

Par VOIE PÉRITONÉALE, on a inoculé les souches aviaires n[os] 4 et 5 à 14 souris à la dose de 0 milligr. 1. Les résultats obtenus ont été identiques aux précédents.

LÉSIONS PROVOQUÉES CHEZ LA SOURIS PAR LES TROIS TYPES DE BACILLE TUBERCULEUX.

Les bacilles des mammifères déterminent chez la souris des lésions qui sont tout à fait comparables entre elles ; pour cette raison, nous les envisageons ensemble. Il semble que les bacilles de ces deux types, lors de l'inoculation par voie veineuse ou péritonéale, soient, pour la plupart, fixés par les poumons où ils trouvent des conditions favorables à leur multiplication. Les lésions qui prennent naissance à la suite de cette localisation sont très graves, très étendues lorsque la souche est suffisamment virulente et la dose assez forte, 0,1 à 0 milligr. 01 pour les souches humaines, 0,01 à 0 milligr. 001

pour les souches bovines. Dans ces conditions, les bacilles provoquent quelquefois très vite, en seize à vingt jours, la formation dans le tissu pulmonaire de foyers nodulaires nécrotiques



FIG. 1. — Poumons de souris inoculée avec la souche H175F à la dose de 0,1 mg, morte 21 jours après.

plus ou moins volumineux, isolés ou confluents, formant alors une masse caséeuse qui englobe les bronches et les alvéoles.



FIG. 2. — Poumons de souris inoculées avec des souches bovines à la dose de 0,1 mg.

A côté de ces gros nodules caséeux, on peut rencontrer de petits tubercules de nature épithélioïde.

Les souches humaines, plus que les souches bovines, provoquent assez souvent une pneumonie sans formations nodulaires ; les bacilles sont très nombreux dans le tissu altéré.

Les doses très faibles — 10^{-5} milligramme — de bacilles virulents, ainsi que les souches peu virulentes, même à forte dose, produisent, à la longue, de très fins tubercules gris, translucides, de nature histiocytaire, dispersés dans la masse pulmonaire saine et contenant très peu de bacilles ; parfois même ils n'en contiennent pas. Les animaux inoculés dans ces conditions ayant été sacrifiés au bout de quatre à cinq mois, on ne peut savoir comment aurait pu se poursuivre l'évolution de ces lésions.

Le foie est, en règle générale, hypertrophié ; exceptionnellement, il peut présenter des foyers nécrotiques visibles à l'œil



FIG. 3. — De gauche à droite : rate de souris inoculée avec Av 5 ; rate de souris inoculée avec H 220, rate de souris inoculée avec B 28 P ; rate de souris normale.

nu. La lésion histologique est constituée par une infiltration leucocytaire diffuse, surtout périvasculaire, parfois par la présence de petits nodules, rarement nécrosés, contenant des bacilles.

La rate peut avoir plusieurs fois le volume normal. On y observe des plages épithélioïdes plus ou moins étendues, de la stase veineuse, de la congestion, quelquefois de la dégénérescence amyloïde et des mégacaryocites (avec de faibles doses).

Les reins et le myocarde ne présentent pas de lésions macroscopiques ; au microscope, on trouve des nodules caséeux (rein) ou réticulaires (myocarde).

Chez les souris inoculées par voie péritonéale, il existe assez souvent des abcès situés autour du foie, de la rate ou en d'autres points de la cavité ; le pus de ces abcès contient de nombreux bacilles acido-résistants. Nous donnons ci-après le

protocole concernant les lésions anatomo-pathologiques de quelques souris (3).

Souris inoculée à la dose de 0 milligr. 1 avec la souche 175 F ; morte en vingt jours. Macroscopiquement : nombreux nodules nécrotiques dans les poumons ; gros foie et rate. Histologiquement, dans les *poumons :* œdème alvéolaire, amas leucocytaire, nodules caséeux avec très nombreux bacilles ; dans le *foie :* congestion, infiltration leucocytaire diffuse surtout périvasculaire et nodules histiocytaires à centre parfois nécrosé, bacilles nombreux ; dans la *rate :* stase, prolifération réticulaire, mégacaryocytes, plasmocytes, bacilles nombreux ; dans les *reins :* nodules caséeux à bacilles nombreux ; dans le myocarde : nodules réticulaires à bacilles peu nombreux.

Souris inoculée à la dose de 0 milligr. 1 avec la souche 180 P ; morte au bout de trente jours. Macroscopiquement : pneumonie, gros foie et grosse rate. Microscopiquement : *poumons :* infiltration histioleucocytaire diffuse sans nodules ; nombreux polynucléaires, alvéolite macrophagique, bacilles nombreux, disséminés ; *foie :* infiltration diffuse et nombreux petits nodules histio-leucocytaires, bacilles peu nombreux ; la *rate* est hémorragique ; prolifération réticulaire diffuse, nombreux polynucléaires et mégacaryocytes, bacilles peu nombreux, intracellulaires.

Souris inoculée avec la souche 180 F (peu virulente) à la dose de 0 milligr. 1 ; sacrifiée au bout de quatre-vingt-dix jours. Macroscopiquement : très petits nodules gris, translucides, dans les poumons ; rate et foie normaux. Microscopiquement : dans le *poumon :* nombreux petits nodules histiocytaires au sein du tissu sain, congestion, très rares bacilles ; *foie :* quelques nodules périvasculaires, rares bacilles ; *rate :* stase veineuse, prolifération lympho-réticulaire, mégacaryocytes, pas de bacilles visibles.

Souris inoculée avec la souche B 28 P à la dose de 0 milligr. 1 ; morte au bout de trente jours. Macroscopiquement : dans le poumon, nombreux nodules nécrotiques ; gros foie avec de petits tubercules ; très grosse rate. Microscopiquement : *poumons :* larges zones de nécrose englobant alvéoles et bronches, très nombreux bacilles dispersés dans ces nappes ; *foie :* infiltration leucocytaire massive, petits nodules à polynucléaires, parfois nécrosés, bacilles en amas au niveau des nodules inflammatoires.

Rate hémorragique, riche en polynucléaires et mégacaryocytes, bacilles en petits amas, isolés, intracellulaires.

Les souches aviaires provoquent chez la souris des lésions qui se distinguent nettement de celles qui prennent naissance à la suite de l'inoculation de bacilles virulents du type humain ou du type bovin Il semble que, dans le cas des

(3) L'examen histologique a été fait, dans le service de M. Bablet, par M[lle] Fr. Bloch, à qui nous présentons nos plus vifs remerciements.

souches aviaires, les bacilles se fixent plutôt dans la rate et le foie que dans les poumons. En effet, les lésions pulmonaires macroscopiques n'apparaissent que très tard, après deux à trois mois. Chez les souris qui meurent avant ce délai, on trouve, microscopiquement, des lésions nodulaires massives dans le foie et la rate, tandis que dans les poumons elles sont moins développées et elles peuvent être limitées à une légère infiltration. Chez les souris qui meurent tardivement, on trouve dans les poumons des nodules petits, grisâtres, jamais nécrotiques, qui sont dispersés dans le tissu pulmonaire sain. Il arrive que les tubercules fusionnent, occupant ainsi tout le poumon, qui prend alors l'aspect d'une masse tumorale, grisâtre.

La rate et le foie ne présentent qu'une augmentation de volume, surtout la rate, qui atteint des dimensions considérables ; les nodules, visibles au microscope, ne deviennent que très rarement visibles à l'œil nu ; dans ce cas, la rate est dure et sa surface mamelonnée.

Voici, à titre d'exemple, deux observations :

Souris inoculée par voie péritonéale avec la souche Av. 5 à la dose de 0 milligr. 1 ; morte après trente-trois jours. Poumons normaux. Rate et foie légèrement tuméfiés. Microscopiquement : *poumons :* infiltration leucocytaire diffuse de la trame, très petites plages d'alvéolite macrophagique, bacilles peu nombreux. *Foie :* nombreux petits nodules histioleucocytaires, contenant des amas de bacilles. *Rate :* plages épithélioïdes disséminées, bacilles nombreux. *Ganglions trachéo-bronchiques* envahis par de petites plages épithélioïdes avec nombreux bacilles.

Souris inoculée par voie veineuse avec la souche Av. 5 à la dose de 0 milligr. 1 ; morte au bout de cent trente jours. Présence de nodules gris dans les poumons ; grosse rate, dure ; gros foie. Microscopiquement : *poumons :* plages d'alvéolite épithélioïde formant des nodules plus ou moins confluents et contenant d'innombrables bacilles. *Foie* et *rate :* semis dense de nodules épithélioïdes ; bacilles innombrables au niveau des nodules seulement.

Possibilité de déterminer le type d'une souche de bacille tuberculeux par l'inoculation intraveineuse a la souris.

Il résulte de nos expériences qu'on peut facilement, et d'une manière très nette, distinguer, par inoculation intraveineuse à la souris, les souches appartenant au type aviaire de celles

qui appartiennent aux types des mammifères. La durée de la maladie, les lésions constatées sont très différentes. Il faut cependant remarquer que les faibles doses de bacilles virulents de type humain ou bovin, ainsi que les doses fortes des souches peu virulentes des mêmes types, peuvent produire dans les poumons les mêmes granulations grises translucides qu'engendrent les souches aviaires ; mais, tandis que pour ces dernières les organes sont gorgés de bacilles, pour les autres ils n'en contiennent que très peu.

La distinction des souches humaines des souches bovines par l'inoculation à la souris s'avère plus difficile, car les lésions provoquées chez cet animal par l'un ou l'autre de ces types sont identiques. La durée de la maladie a été invoquée par certains auteurs comme permettant de faire cette distinction. C'est ainsi que Trommsdorff, E. Peter, W. Binder ont affirmé que, par voie veineuse, le type bovin tue beaucoup plus vite la souris que le type humain. Ces résultats, qui s'expliquent par le nombre réduit des souches et des souris inoculées, n'ont été confirmées ni par les expériences de Bruno Lange, ni par les nôtres. C'est un fait que nous avons déjà signalé que, parmi les souches virulentes du type humain, certaines, inoculées même à forte dose, 0 milligr. 1, provoquent chez la souris une maladie qui dure longtemps — trois mois et même plus. Mais il en est d'autres qui, à la même dose, tuent plus rapidement la souris que les souches bovines. La souche 175 F, par exemple, tue plus vite la souris que n'importe quelle souche bovine ; il s'agit néanmoins d'une souche humaine typique d'après ses caractères de culture et sa faible pathogénéité pour le lapin. D'une façon générale cependant, il apparaît que les souches bovines à la dose de 0,1 et 0 milligr 01 provoquent chez la souris des lésions plus rapidement évolutives que les lésions produites par des souches humaines.

Malgré les exceptions que nous venons de signaler, il ressort de nos expériences que la dose de 0 milligr. 001 convient au diagnostic différentiel des deux types de bacilles des mammifères. En examinant les tableaux concernant la durée de la maladie, l'intensité des lésions et le nombre des bacilles trouvés dans les organes des souris inoculées à la dose de 0 milligr. 001, d'une part avec les souches humaines, d'autre part avec les

souches bovines, on remarque que les premières n'entraînent qu'exceptionnellement la mort de la souris, tandis que les dernières réussissent presque sans exception à créer à cette dose des lésions mortelles. *On peut admettre que si, sur 4 souris inoculées à la dose de* 0 *milligr.* 001, 2 *au moins meurent avant trois mois avec des lésions nodulaires dans les poumons et, dans les organes, des bacilles en assez grand nombre, la souche appartient au type bovin.* Bien entendu, cette méthode ne peut pas remplacer le lapin, qui est l'animal différentiel par excellence de ces deux types, mais nous pensons que, complétée par l'étude des caractères culturaux, elle peut rendre de réels services.

Conclusions.

Un nombre assez important de souches de bacilles tuberculeux récemment isolées, appartenant aux types humain, bovin ou aviaire, ont été inoculées, surtout par voie veineuse, à des souris blanches. Les résultats de ces inoculations nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° La souris blanche est assez résistante à l'infection tuberculeuse ; mais si les faibles doses de bacilles, 10^{-5} milligrammes, de n'importe quel type ne produisent jamais une maladie à évolution rapide et mortelle, les doses plus fortes de l'ordre de 0,1 à 0 milligr. 01 de bacilles virulents entraînent régulièrement la mort.

2° Les souches humaines non virulentes pour le cobaye ne le sont pas non plus pour la souris. Parmi les souches ayant la même virulence pour le cobaye, on rencontre des souches qui se comportent autrement lors de l'inoculation à la souris. Cette discordance ne permet pas de faire un titrage de ces souches sur la souris tant qu'on n'aura pas démontré qu'il existe une relation entre la virulence des bacilles pour la souris et la virulence pour l'homme. Nous pensons que les différences observées dans la réponse du cobaye et celle de la souris à l'inoculation correspondent à des différences réelles et intrinsèques de ces souches.

3° Si, pour les souches humaines, la virulence pour le cobaye et la virulence pour la souris ne sont pas toujours parallèles, il n'en est pas de même pour les souches bovines. En effet,

la souris répond d'une façon assez constante à l'inoculation des bacilles de ce type ; pour cette raison, le titrage de la virulence des souches bovines sur la souris est possible.

4° Les bacilles aviaires sont, de beaucoup, moins virulents pour la souris que les bacilles tuberculeux des mammifères. Ils ne tuent la souris qu'à la longue et les lésions pulmonaires ne deviennent visibles que lorsque la maladie existe depuis longtemps, au moins deux mois.

5° L'inoculation à la souris permet de préciser si une souche appartient ou non au type aviaire. L'évolution de la maladie et les lésions provoquées y sont suffisamment caractéristiques Au contraire, les lésions produites par les bacilles humains et bovins chez la souris sont les mêmes quand on inocule de fortes doses de ces germes. Mais si l'on inocule à la souris, par voie veineuse, 0 milligr. 001 de ces bacilles, on constate que les souches bovines provoquent encore des lésions évolutives mortelles, alors que, en règle générale, les bacilles humains ne déterminent que des lésions beaucoup plus bénignes.

6° Les bacilles des mammifères se montrent beaucoup moins actifs par voie péritonéale que par voie veineuse ; les bacilles aviaires donnent des résultats sensiblement égaux par les deux voies.

BIBLIOGRAPHIE

Béquignon (R.) *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 581.
Binder (W.). *Zbl. f. Bakt. Ref.*, **63**, 1915, p. 4.
Boquet (A.) et Nègre (L.). Ces *Annales*, **35**, 1921, p. 142.
Boquet (A.), Nègre (L.) et Valtis (J.). *C R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 1665.
Browning (C.) et Gulbrausen (R.). *J. of Hyg.*, **25**, 1926, p. 323.
Cobbett (L.) *The causes of tuberculosis.* Cambridge, 1917.
Combiescu (D.) et Botez (V.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 621 et 624.
Griffith (A. S.). *R. C. T.*, Sec Int. Rep. II. App. 3, 1907.
Gum (F.), Nungester (W.) et Haugen (E.). *Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **31**, 1933-1934, p. 527.
Hemmert-Halswick. *Arch. f. Tierh.*, 1934, p. 67.
Jong (de). XI[e] Congrès Inter. d'Hyg. et Dermat., Bruxelles, 1903.
Koch (Robert). *Die Aetiologie der Tuberkulose*, 1884.
Koch (M.) et Rabinowitsch (L.). *Virchow's Archiv*, **190**, 1907, p. 246.
Kolle (W.) et Schlossberger (H.). *Z. f. Hyg*, **100**, 1923, p. 107.
Lange (B.). *Z. Hyg.*, **98**, 1922, p 229.
Lange (B.). *Z. Tub.*, **57**, 1930, p. 129-209.
Peter (E.). *Zbl. f. Bakt.*, I. Orig., **62**, 1912, p. 1.

RÖMER. *Zbl. f. Bakt. Ref.*, **33**, 1903, p. 348.
SAENZ et COSTIL. *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 836.
SCHWABACHER, HERTA et WILSON (G. S.). *Tubercle*, **18**, 1936-1937, p. 442.
SELLARDS (A. W.) et FINKSTONE (H.). *Bull. Soc. Path. exotique*, **29**, 1936, p. 847.
STAMATIN (N. et L.). *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 511.
STAMATIN (N.) et BLOCH (Fr.). *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939.
STRAUS (I.). La Tuberculose et son bacille, 1895.
STREMPEL. *Z. Tbk.*, **71**, 1934, p. 62.
TROMMSDORFF. *Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte*, **32**, 1909, p. 568.
VALTIS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 1663.
WEBER. *Zbl f. Bakt. I. Orig.*, **64**, 1912, p. 243.
WEBER et BOFINGER. *Tub. Arbeit. a. d. Kais. Gesundheitsamte*, fasc. 1, 1904, p. 83.

LES DIFFÉRENCES ENTRE LE VIBRION EL TOR ET LE VIBRION CHOLÉRIQUE

par R. GISPEN.

(*Institut d'Hygiène de l'Université d'Amsterdam, Directeur* : PROFESSEUR J. J. VAN LOGHEM.)

Récemment plusieurs auteurs ont porté leur attention sur la détermination du vibrion El Tor.

Pendant les années 1930-1937, Doorenbos a isolé ce vibrion dans un grand nombre de cas sur des pèlerins qui ne souffraient pas de choléra. En 1938, de Moor [**1**] décrit une épidémie d'une maladie cholériforme à Célèbes, près de Macassar. Les souches provenant de cette épidémie étaient agglutinables vis-à-vis d'un sérum anticholérique et présentaient une forte hémolyse en bouillon au sang. Le professeur Van Loghem [**2**] examina deux souches de Macassar et put confirmer qu'elles sont identiques au vibrion El Tor spécifique.

La distinction du vibrion El Tor dans le groupe des « vibrions agglutinables » a surtout pour base le pouvoir exo-hémolytique en bouillon au sang de chèvre, en vingt-quatre heures ; le vibrion cholérique, examiné de même façon, présente une endo-hémolyse (Van Loghem).

Malgré tous les efforts, on n'a pas réussi à démontrer quelque différence de structure antigénique entre le vibrion cholérique et le vibrion El Tor. Les souches cholériques, de même que les souches El Tor, sont agglutinables par les sérums anticholériques O (Gardner et Venkatraman [**3**]) et par les sérums préparés avec les antigènes O desséchés de Bruce White [**4**].

Pour cette raison, plusieurs souches hémolytiques, qui sont étiquetées comme « vibrion El Tor », mais ne présentent pas d'agglutination spécifique vis-à-vis des sérums anticholériques O, ont été classées par nous dans des groupes différents des vibrions aquatiques » (e a. Doorenbos 16, D. 20, D. 49, D 67 ; 1930-1931).

Certains auteurs considèrent le vibrion El Tor comme une variante du vibrion cholérique, se distinguant par une action hémolytique prononcée. Cette conception n'est pas appuyée par les recherches des dernières années.

Linton [5] a étudié les éléments chimiques des vibrions différents. Le vibrion cholérique et le vibrion El Tor possèdent le même polysaccharide, tandis que leurs protéines ne sont pas identiques. Le vibrion cholérique contient la protéine I et le vibrion El Tor la protéine II. Cette différence chimique s'allie à une différence de fonctions. A cet égard, la réaction de Vogues-Proskauer, modifiée par Barrit, est importante.

Taylor, Pandit et Read [6] ont recommandé cette réaction pour différencier le vibrion cholérique et le vibrion El Tor. Nos propres recherches faites à ce point de vue avec 81 souches cholériques et 31 souches d'El Tor, eurent comme résultat une réaction négative pour la plupart (76) des souches cholériques et une réaction positive pour un grand nombre (23) des souches El Tor. Ainsi la valeur de la réaction de Vogues-Proskauer est limitée à cet égard (1).

Grossmann [7] a mesuré le pH des cultures du vibrion cholérique et du vibrion El Tor dans des milieux glucose-peptone et mannite-peptone pendant quelques jours après l'ensemencement. Dans les cultures du vibrion El Tor, il trouva en général un pH plus élevé que dans les cultures cholériques.

Linton, Mitra et Mullick [8] ont comparé des vibrions différents, quant à leur glycolyse dans un milieu aérobie. Ces auteurs ont trouvé que le vibrion El Tor ne présente pas de glycolyse aérobie *dans des circonstances spéciales* où le vibrion cholérique en présente. En utilisant un manomètre de Barcroft, ils examinaient les vibrions dans un milieu non peptoné, contenant du glucose et 0,1 p. 100 $NaHCO_3$; les lectures étaient faites après quarante minutes.

En suivant une autre méthode, Baars [9] a obtenu des résultats opposés à ceux de Linton. Il démontra que le vibrion El Tor, ensemencé dans un milieu contenant du glucose, produit mieux de l'acide carbonique que le vibrion cholé-

(1) Postérieurement, Mochtar et Baars ont obtenu un résultat identique. *Geneesk. tijdschrift voor Nederl.-Indie*, 1938.

rique. Cependant il employait un milieu peptoné, ne contenant pas de $NaHCO_3$ et faisait les lectures après vingt-deux heures. Ainsi les deux auteurs n'ont pas examiné la même propriété et par conséquent leurs résultats différents ne peuvent pas être comparés. Reste à savoir si la différence trouvée par Linton est qualitative ou quantitative. Aussi, dans ce dernier cas, la « glycolyse aérobie » serait d'importance pour les questions concernant le vibrion El Tor.

La toxicité des vibrions El Tor, décrite par Kraus et Pribram, n'a pas été examinée encore suffisamment à ce point de vue. Botman [10] a fait des recherches sur la toxicité des vibrions pour le rat blanc. Des injections intrapéritonéales de cultures en bouillon de vibrion El Tor (phénolées ou filtrées) tuent la plupart des rats en vingt-quatre heures, tandis que les mêmes injections de vibrion cholérique sont bien supportées le plus souvent. Cependant, cette méthode ne satisfait pas encore aux exigences du diagnostic du vibrion El Tor.

En résumé, l'hémolyse en bouillon au sang de chèvre et la réaction de Vogues-Proskauer-Barrit sont les seules méthodes pratiques pour discerner le vibrion El Tor du vibrion cholérique. En raison de ces faits, une autre méthode de distinction est décrite ci-dessous.

La thermo-résistance des vibrions agglutinables.

En 1902, Eisenberg et Volk [11] ont publié des recherches montrant qu'une suspension de certaines bactéries devient inagglutinable par un chauffage de brève durée à 80°-100°. Suivant Porges [12], l'agglutinabilité d'une telle suspension chauffée se rétablit par un chauffage prolongé à 100°.

Porges, Neisser et Friedman sont d'avis que ces changements de l'agglutinabilité et ceux de la protéine bactérienne sont étroitement liés. La découverte de l'antigène thermolabile (H) et de l'antigène thermostable (O) par Weil et Félix a fait oublier les recherches de Porges. Sans doute le chauffage d'une suspension à 100° peut détruire l'antigène H. Pourtant, en tenant compte de cette destruction de l'antigène H, on ne peut pas expliquer l'inagglutinabilité d'une suspension

cholérique, chauffée pendant quinze minutes à 100°, vis-à-vis du sérum anticholérique O. En outre, toutes les agglutinines du sérum anticholérique O sont encore absorbées par la suspension cholérique, chauffée et inagglutinable ; ainsi, l'antigène O se présente intact. Linton, Mitra et Seal [**13**] ont montré que la charge électrique des vibrions est accrue et que les protéines bactériennes sont dissoutes et hydrolysées par le chauffage En élevant la charge négative des bactéries par chauffage, on arrive à tel point que leur répulsion mutuelle empêche leur agglutination, même en présence d'un sérum spécifique (Northrop et de Kruif [**14**]).

En effectuant des épreuves d'agglutination avec des suspensions salines chauffées, j'ai trouvé une différence entre les souches cholériques et les souches du vibrion El Tor. L'agglutinabilité du vibrion El Tor n'est pas modifiée par un chauffage à 56° pendant trois heures, tandis qu'après ce traitement le vibrion cholérique devient inagglutinable, c'est-à-dire que les suspensions de ce genre ne se clarifient pas au contact d'un sérum anticholérique. Une température de 60° est nécessaire pour détruire l'agglutinabilité du vibrion El Tor. Cette différence de thermostabilité peut être mise en application comme méthode permettant de discerner ces deux vibrions.

Méthode. — Une suspension suffisamment dense est obtenue en émulsionnant deux cultures de dix-huit heures sur gélose dans 10 cent. cubes de solution saline. Il est important que cette suspension ne contienne aucune trace de gélose, de bouillon ou de peptone.

Puis, 5 cent. cubes de cette suspension sont chauffés pendant trois heures au bain-marie. Il faut que la température ne dépasse pas les limites de 56°-57°. Après refroidissement, les suspensions chauffées et non chauffées sont agglutinées par un sérum anticholérique. Les tubes d'agglutination sont mis à l'étuve à 46°.

On fait la lecture après seize ou dix-huit heures, en notant spécialement les tubes qui présentent une clarification complète ou à peu près complète [en abrégé : cl ou (cl)].

Les conditions physico-chimiques importent pour obtenir des résultats uniformes. Nous avons toujours employé une solution saline alcalinisée (pH : ± 7,3). Il faut que la suspension chauffée ne soit pas trop diluée : tout au plus I ou II gouttes des dilutions de sérum sont ajoutées à 0 c. c. 5 de suspension.

Enfin, le contrôle de la température nécessite une attention continuelle ; le thermomètre placé au centre du bain-marie ne doit pas reposer sur le fond, ni sur de l'ouate. Les suspensions, qui ne montrent pas d'agglutination après le chauffage, sont thermolabiles. Aussi les

souches qui présentent, après le chauffage, une agglutination partielle — c'est-à-dire sans clarification du milieu — sont tout de même considérées comme thermolabiles.

En suivant cette méthode, nous avons examiné une collection de vibrions de l'Institut d'Hygiène de l'Université d'Amsterdam.

Cette collection contient :

81 souches cholériques, pour la plupart de date assez ancienne ; 14 souches proviennent de l'épidémie de Siam (1937).

31 souches El Tor, spécifiques et non spécifiques. Une de ces souches appartient à la série originale de Gotschlich (1905). Les autres sont dues à la générosité du docteur Doorenbos (Alexandrie) et du docteur de Moor (Macassar). Les souches du Docteur Doorenbos ont été isolées en 1930-1934 à Tor, les souches du docteur de Moor ont été récemment isolées au cours d'une série de cas sporadiques d'une maladie cholériforme, observée à Célèbes (1937-1938).

En premier lieu, nous avons examiné les propriétés générales, biochimiques, hémolytiques et hémodigestives de toutes les souches. Seules, les souches spécifiques présentant une agglutination complète vis-à-vis des sérums anticholériques O, ont été impliquées dans les examens touchant la thermostabilité.

La plupart des souches cholériques étaient thermolabiles : leur agglutinabilité vis-à-vis des sérums anticholériques était détruite par le chauffage, ou du moins réduite à une agglutination partielle (c'est-à-dire sans clarification du milieu). Au contraire, l'agglutinabilité des souches El Tor n'était pas changée après ce traitement (tableau).

En agglutinant les suspensions chauffées de certaines souches El Tor, on voit même une réaction quelque peu renforcée. Il est notable que les souches de Macassar, qui suscitèrent certaines difficultés lors de l'examen du pouvoir exo-hémolytique (Van Loghem, de Moor, 1938) ne se distinguent pas des vibrions El Tor quant à la thermostabilité à 56°.

Quelques rares souches cholériques (Epidémie russe, Siam 2/79) présentent une exception ; elles se comportent, après le chauffage, à peu près comme les souches El Tor.

	SÉRUM ANTICHOLÉRIQUE préparé avec Saoda vivant										EXO-HÉMOLYSE
	Emulsion saline non chauffée					Emulsion saline chauffée à 56°C pendant 3 heures					
	C	50	100	200	400	C	50	100	200	400	
Souches El Tor :											
El Tor 1	—	cl	cl	cl	(cl)	—	cl	cl	(cl)	(cl)	+
El Tor 2	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	(cl)	+
El Tor 3	—	cl	cl	(cl)	(cl)	—	cl	cl	(cl)	(cl)	+
El Tor 5	—	cl	cl	cl	(cl)	—	cl	cl	cl	cl	+
El Tor 6	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
El Tor 7	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
El Tor 8	—	cl	cl	(cl)	(cl)	—	cl	cl	(cl)	++	+
El Tor 9	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
Tor A.	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
Tor 3	—	cl	cl	(cl)	(cl)	—	cl	cl	(cl)	+++	+
Tor 4	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
Tor 5	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	(cl)	+
Tor 7	—	cl	cl	cl	(cl)	—	cl	(cl)	(cl)	(cl)	+
Tor 8	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	(cl)	(cl)	+
Tor 9	—	cl	cl	cl	(cl)	—	cl	cl	(cl)	(cl)	+
Tor 10	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	(cl)	+
Tor 11	—	cl	cl	cl	(cl)	—	cl	cl	(cl)	(cl)	+
R. G. A. 3.	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
Kop 14	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	(cl)	+
B.	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
D 6	—	(cl)	++	++	+	—	(cl)	++	++	+	+
D 47	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	cl	+
D 80		cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	cl	(cl)	+
Souches cholériques :	—										
Saoda	—	cl	cl	cl	cl	—	(cl)	+++	++	++	—
Cairo 2	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Cairo 3	—	cl	cl	(cl)	++	—	+	+	+	—	—
Cairo 6	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
Bagdad I	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Bagdad II	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
Tan A Kio	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Boelan	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	++	+	—	—
Mekka-Medan	—	cl	cl	cl	cl	—	++	++	+	—	—
Deli 193.	—	cl	cl	cl	cl	—	(cl)	(cl)	++	+	—
Kindje Boot.	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	++	+	—	—
Russ. Epid..	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	cl	(cl)	(cl)	—
Pever. 3.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Pever. 4.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Pever. 5.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
Pever. 7.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
Pever. 9.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Pever. 11	—	(cl)	(cl)	+++	++	—	—	—	—	—	—
Chol. I	—	cl	cl	cl	cl	—	++	++	+	+	—
82 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	(cl)	++	++	+	—
83 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
84 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
85 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
86 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
89 B. I..	—	cl	cl	cl	cl	—	+	+	+	+	—

	SÉRUM ANTICHOLÉRIQUE préparé avec Saoda vivant										EXO-HÉMOLYSE
	Emulsion saline non chauffée					Emulsion saline chauffée à 56°C pendant 3 heures					
	C	50	100	200	400	C	50	100	200	400	
91 B I.	—	cl	cl	cl	cl	—	++	—	—	—	—
92 B. I	—	cl	cl	cl	cl	—	(cl)	+++	+	—	—
155 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
213 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
228 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	(cl)	+++	++	++	—
228 B. I. l. h.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
254 B. I.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
259 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
260 B. I.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
261 B. I.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	+++	++	++	++	—
262 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	++	+	+	—	—
263 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
264 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
266 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	++	+	+	—	—
268 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
270 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
271 B. I.	++	cl	cl	(cl)	(cl)	—	—	—	—	—	—
272 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
273 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
274 B. I.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
275 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
276 B. I.	—	cl	cl	cl	(cl)	—	++	++	++	+	—
277 B. I.	+	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
279 B. I	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
294 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
295 B. I.	—	cl	cl	cl	cl	—	++	+	—	—	—
296 B I.	—	cl	cl	(cl)	++	—	—	+	+	++	—
Siam 2/79	—	cl	cl	cl	cl	—	cl	(cl)	(cl)	(cl)	—
Siam 3/79	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Siam 4/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	+	+	+	—
Siam 5/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
Siam 6/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	+	+	—	—
Siam 7/79	—	cl	cl	cl	(cl)	—	—	—	—	—	—
Siam 8/79	—	cl	cl	cl	cl	—	++	+	+	+	—
Siam 9/79	—	cl	cl	cl	cl	—	++	++	++	++	—
Siam 11/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
Siam 12/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	—	—	—	—
Siam 17/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+++	++	+	+	—
Siam 20/79	—	cl	cl	cl	cl	—	+	+	—	—	—
Siam 21/79	—	cl	(cl)	(cl)	(cl)	—	++	+	+	+	—
Siam 22/79	—	cl	(cl)	(cl)	(cl)	—	—	—	—	—	—
Inaba.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Hikojima.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Ogawa.	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Heiberg 8	—	cl	cl	(cl)	+++	—	++	+	+	—	—
Heiberg 31	—	cl	cl	cl	(cl)	—	++	+	+	+	—
Heiberg 34	—	cl	cl	cl	cl	—	—	—	—	—	—
Heiberg 36	—	cl	cl	(cl)	(cl)	—	—	—	—	—	—

Cl, clarification; +++, agglutination sans clarification.

L'aspect macroscopique permet déjà de distinguer les suspensions thermolabiles et thermostabiles : après le chauffage la suspension thermolabile présente plus de viscosité. En agitant le tube contenant la suspension cholérique chauffée, on voit monter lentement des bulles d'air. Une heure de centrifugation à 3.000 tours par minute, ne clarifie pas complètement cette suspension, tandis que le même traitement peut clarifier la suspension cholérique non chauffée.

On ne trouve pas ces changements physico-chimiques dans les suspensions chauffées du vibrion El Tor ; celles-ci ressemblent tout à fait aux suspensions non chauffées du même vibrion et du vibrion cholérique. L'agglutinabilité des suspensions thermolabiles se rétablit :

a) Par un chauffage prolongé à 100°

b) Par addition de bouillon ou de peptone à la suspension chauffée.

Les recherches concernant le mécanisme de l'agglutination des bactéries sensibilisées (Northrop et de Kruif, Shibley) ont confirmé jusqu'à un certain point les conceptions antérieures, reconnaissant la protéine bactérienne comme un facteur important dans l'agglutination. Dans le même ordre d'idées nous supposons que la différence de thermostabilité entre le vibrion cholérique et le vibrion El Tor se rattache à la différence de leurs protéines, trouvée par Linton.

Les caractères du vibrion cholérique et du vibrion El Tor se résument ainsi :

	VIBRION cholérique	VIBRION El Tor
Caractères généraux des vibrions typiques (Koch, 1883)	+	+
Agglutination par le sérum anticholérique O (Gardner et Venkatraman, 1935)	+	+
Phénomène de Pfeiffer (1894)	+	+
Hemodigestion sur gélose au sang (van Loghem, 1911) et sur gélose au sang hémolysé (Snapper, 1918)	+	+
Exo-hémolyse en bouillon de Liebig au sang de chèvre ou de mouton (Kraus et Pribram, 1906; van Loghem, 1911, 1924)	—	+
Endo-hémolyse, c'est-à-dire hémolyse tardive en bouillon au sang (Lampe, 1922; van Loghem, 1924)	+	+

Exotoxine vis-à-vis des rats blancs (Botman, 1936)	—	+
Acidification suivant type I (Heiberg, 1935)	+	+
Réaction de Vogues-Proskauer (Barrit)	— (+)	+ (—)
Polysaccharide I (Linton, 1933)	+	+
Protéine I (Linton, 1934)	+	—
Protéine II (Linton, 1934)	—	+
Glycolyse aérobie (Linton, 1936) (1)	+	—
Thermostabilité à 56°C	—	+

Quant aux caractères généraux et à la structure chimique, le vibrion El Tor occupe une position intermédiaire entre le vibrion cholérique et les vibrions non agglutinables. Bien que la structure antigénique du vibrion El Tor soit identique à celle du vibrion cholérique, nous considérons ces deux vibrions comme les représentants d'espèces différentes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] DE MOOR. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, **30**, 1938.
[2] VAN LOGHEM. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, **30**, 1938, p. 1520.
[3] GARDNER et VENKATRAMAN. *Journ. Hyg.*, 1935, p. 262
[4] BRUCE WHITE. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, suppl. n° 7, 1934, p 73.
[5] LINTON. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, **27**, 1935.
[6] TAYLOR, READ et PANDIT. *Ind. Journ. Med. Res* , **24**, 1936
[7] GROSSMANN. *Zeits. f Hyg.*, **119**, 1937.
[8] LINTON, MITRA et MULLICK. *Ind. Journ. Med Res.*, **23**, 1936, p. 589.
[9] BAARS. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1938, p. 43
[10] BOTMAN. *Thèse de l'Université d'Amsterdam*, 1936
[11] EISENBERG et VOLK. *Zeits. f. Hyg.*, **40**, 1902, p. 155.
[12] PORGES. *Zeits. f. Exper. Path. u. Therapie*, **1**, 1905, p. 621
[13] LINTON, MITRO et SEAL. *Ind. Journ. Med. Res.*, **24**, 1936, p. 19.
[14] NORTHROP et DE KRUIF. *Journ. of General Physiol.*, **4**, p. 639.
[15] GISPEN. *Thèse de l'Université d'Amsterdam*, 1938.

(1) Seulement dans les circonstances spéciales, suivant la méthode de Linton.

UNE TECHNIQUE FACILE ET RAPIDE DE MISE EN ÉVIDENCE DES CILS BACTÉRIENS

par Emile NOVEL.

(*Travail du Laboratoire de Bactériologie de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Genève.* Directeur : Prof. Th. Reh.)

De tous les procédés de coloration employés en microscopie bactériologique, il est indéniable, et tous les auteurs sont unanimes sur ce point, que ceux qui tentent de mettre en évidence les cils bactériens sont de réussite particulièrement difficile. Quelles que soient les méthodes utilisées, et elles sont des plus nombreuses, quelque habileté que déploie l'opérateur, les résultats obtenus sont très souvent inégaux et parfois même décevants.

Pourtant de façon habituelle, la maîtrise du technicien n'est point en cause. C'est bien plutôt la qualité et la composition des solutions colorantes, la propreté minutieuse de l'indispensable matériel mineur (lames, verres de montre, pipettes, entonnoirs, etc.), l'âge des souches, le mode de préparation des émulsions microbiennes, l'étalement puis la dessiccation des corps bactériens, le temps de coloration, le lavage même des préparations qu'il faut incriminer lors d'échecs plus ou moins répétés.

Aussi nous a-t-il paru indiqué, après plusieurs mois de travail consacrés, dès 1935, à la recherche d'une technique de coloration simple et rapide d'exposer, dans tous ses détails, une méthode qui nous a donné un pourcentage de succès bien supérieur aux procédés les plus habituellement employés.

Matériel et technique.

Porte-objets. — Il est absolument indispensable de ne se servir que de lames parfaitement propres et dégraissées.

Pour notre compte, nous n'employons que des lames neuves. Celles-ci, traitées comme si elles étaient usagées, sont décapées d'abord avec la solution acide sulfurique-bichromate de potasse selon les méthodes usuelles que préconisent dans leurs techniques Peppler [1], Van Ermengem [2], Tribondeau, Fichet et Dubreuil [3] ainsi que Levenson [4].

Puis, après lavage à l'eau ordinaire, nous laissons séjourner les lames vingt-quatre heures dans un bain de xylol et finalement, comme Lancereaux [5], nous les conservons dans de l'alcool fort (97°-98°). Au moment de l'emploi nous retirons les lames au moyen d'une pince type Debrandt ou Cornet et, après les avoir essuyées avec un chiffon fin, nous les passons lentement trois à quatre fois dans la flamme d'un bec de Bunsen.

Ces détails préparatoires méticuleusement effectués, nous plaçons nos lames les unes à côté des autres sur une platine chauffante aux environs de 50°. Une telle température ne doit pas être dépassée si l'on tient à garder intacte la majorité des flagelles microbiens.

Cultures. — Nous n'utilisons comme cultures que des souches ensemencées sur gélose simple pour les bactéries aérobies (Van Ermengem [2], Hossert [6]) et en bouillon glucosé à 2 p. 1.000 pour les anaérobies (Levenson [4]). Divers autres milieux tels que pomme de terre, gélatine, lait gélatinisé (Peppler [1]), bouillon Martin gélosé (Tribondeau [3]), bouillie de foie (Türner et Davesne [7]) peuvent être également employés, sans présenter toutefois, sauf dans des cas spéciaux, d'avantages appréciables.

L'âge des cultures est un facteur important de réussite pour la coloration des cils. Les meilleures préparations sont réalisées avec des souches très jeunes, de dix à douze heures au plus. Pourtant, si l'espèce est de croissance lente, il convient d'attendre le temps nécessaire à l'apparition de colonies perceptibles macroscopiquement.

Cependant, par notre procédé, nous avons pu colorer des cils à partir de cultures âgées de dix jours et même d'un mois, résultat qu'ont obtenu également, par l'emploi de leurs

méthodes, Hinterberger [8], Tribondeau [3], de Rossi [9], Peppler [1] et plus récemment Isida [10] pour des cultures de quelques jours à cinq mois et demi.

Toutefois, avec de vieilles cultures, la réussite est loin d'être certaine car les éléments microbiens âgés sont, en majorité, dépourvus de cils et seuls quelques individus en présentent un nombre variable, mais incomplet.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats en utilisant, d'autre part, des souches aussi fraîchement isolées que possible

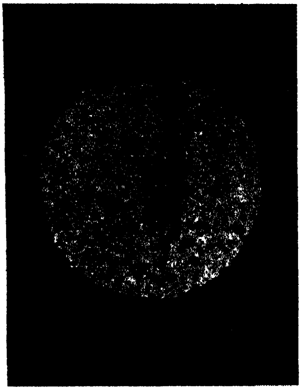


FIG. 1. — Cils de *B. psittacosis* Culture de douze heures. Gros : 1.800

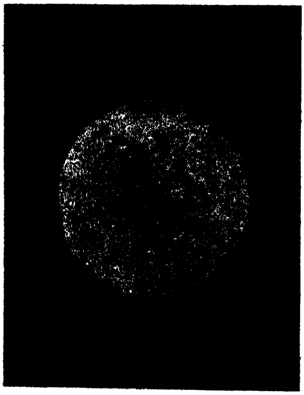


FIG. 2. — Cils de B pseudo-tétanique (Tavel). Culture de quatorze heures. Gros. : 1.800.

de l'organisme. Notre microphotographie (1) [fig. 4] montre un individu d'un groupe de bacilles magnifiquement chevelus, de l'espèce *Proteus vulgaris* dont l'isolement, d'une urine, remontait à vingt-quatre heures. La culture avec laquelle nous avions effectué notre émulsion microbienne était âgée de six heures seulement.

Pour les cultures conservées depuis longtemps en collection,

(1) Il nous est particulièrement agréable de remercier ici très chaleureusement M. J. WIRTH, candidat-médecin, d'avoir réalisé, d'après nos préparations, les belles microphotographies qui illustrent notre publication.

il nous paraît avantageux de pratiquer 5 à 6 passages (repiquage toutes les vingt-quatre heures) en milieu liquide, en bouillon simple notamment, afin de replacer les bactéries dont on veut colorer les cils dans des conditions où elles puissent regagner rapidement et porter au maximum leur motilité. Le dernier repiquage se fait sur gélose simple.

EMULSION MICROBIENNE. — Nous plaçons dans un verre de montre très soigneusement dégraissé (lavage au xylol, puis à

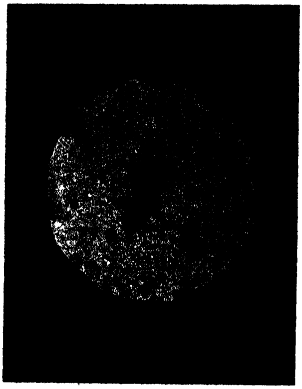


FIG. 3. — Cils de *B. mesentericus vulgatus* Culture de dix heures Gros. : 1.800.

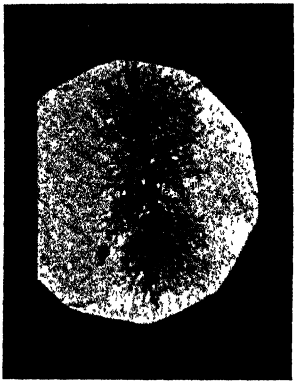


FIG. 4. — Cils de *B. proteus vulgaris* Culture de six heures. Gros. : 1.400.

l'alcool et enfin à l'eau distillée) 2 à 3 cent. cubes d'eau distillée Au moyen d'un fil de platine à œilleton nous prélevons avec précaution et sans racler la gélose une parcelle de culture jeune en ayant soin de ne pas entrer en contact avec l'eau de condensation. Nous portons ensuite l'anse chargée à la surface de l'eau distillée.

Lorsque la culture est facilement émulsionnable, il suffit de la laisser diffuser d'elle-même dans le liquide. Si, au contraire, les colonies ne se diluent qu'avec difficulté, nous promenons légèrement le fil de platine dans l'eau afin d'en faciliter la dispersion. Au bout de vingt à trente secondes nous retirons l'anse du verre de montre. Après ce temps, en effet, l'émulsion, bien que ne présentant pas encore d'opalescence visible, est

suffisamment riche en microbes. D'ailleurs plus une suspension est pauvre en éléments microbiens, plus les individus sont nettement séparés les uns des autres ; ils gardent, en outre, leur parure ciliée complète et la préparation colorée ne montre qu'un minimum de précipités, inévitables avec un mordant tannique.

Pour la préparation de l'émulsion nous n'employons, avec Türner [11] et Bowihl [12] que l'eau distillée à l'exclusion de l'eau physiologique ou de l'eau de robinet (Welcke [13]). Si l'eau distillée détermine il est vrai, par son hypotonicité, un léger gonflement des corps bactériens, l'eau physiologique, par contre, laisse quelquefois déposer des cristaux qui en se dissolvant lors du premier lavage entraînent un certain nombre de microbes. Par surcroît, dans une méthode utilisant l'imprégnation, elle précipite les sels d'argent et cause une opacité plus ou moins marquée de la préparation. L'eau de robinet, enfin, apporte nombre de microorganismes ; même stérilisée et de composition chimique constante — ce qui est loin d'être toujours le cas — elle contient trop souvent encore des sels minéraux et des matières organiques, ce qui n'est pas sans nuire à la netteté de la coloration.

Étalement. — Sur la face flambée de chaque lame nous déposons ensuite de III à V gouttes de l'émulsion. Celles-ci s'étalent d'elles-mêmes en un film liquide d'une extrême minceur. Les gouttes doivent être assez éloignées les unes des autres pour ne point confluer. La dessiccation obtenue nous enlevons immédiatement les lames de la platine chauffante et, sans fixation, nous procédons à la coloration.

En aucun cas nous ne préconisons la fixation quels que soient, par ailleurs, le procédé et le fixateur utilisés, qu'il s'agisse de l'acide osmique (Türner et Davesne [7] ; Aréna et Schwartz [14] ; Van Ermengem [2]), de l'alcool, de l'alcool-sublimé, de l'alcool-éther ou de la simple fixation à la flamme. Les fixateurs chimiques, en effet, agglutinent et empâtent les cils, le flambage risque souvent de les carboniser.

Il convient, en outre, de préparer simultanément avec la

même émulsion toutes les lames que l'on désire colorer. Si l'on ne travaille pas en série il est préférable de refaire une nouvelle suspension microbienne pour chaque préparation.

MORDANT. — De même que dans les techniques de Bunge [15], Löffler [16], Nicolle et Morax [17], Rémy et Sugg [18] nous

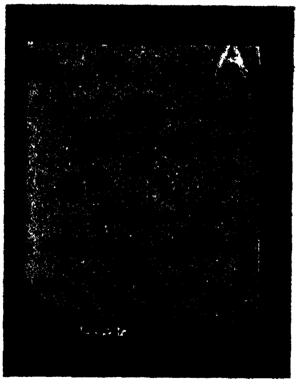


FIG. 5. — Cils de B. d'Aertrycke. Culture de douze heures. Gros. : 1.200.

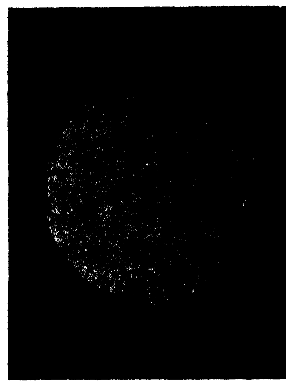


FIG. 6. — Cils de *B. janthinus* Culture de huit jours. Gros : 1.200.

utilisons comme mordant une encre de tannate ferrique comportant le mélange de :

a)	Solution aqueuse de tanin à 20 p. 100 (cent. cubes).	50
b)	Solution saturée à froid de sulfate ferreux (cent. cubes) . . .	40
c)	Solution alcoolique saturée de fuchsine (ou de violet de gentiane) [cent cubes].	7

Il est de toute nécessité de garder séparément les trois solutions a, b et c. Chacune d'entre elles conserve ses propriétés durant plus de six mois à condition d'être placée à l'abri de la lumière et en flacon hermétiquement fermé. D'autre part, le mélange des trois solutions préalablement filtrées ne doit être opéré qu'au moment de l'emploi, le mordant n'étant utilisable, *à froid*, que durant deux à trois heures au plus.

IMPRÉGNATION. — Nous nous servons comme « colorant » de

fond d'une solution préparée selon la formule préconisée par Fontana-Tribondeau pour la coloration des spirochètes qui, à des concentrations variées mais généralement plus faibles, est employée dans les méthodes de Van Ermengem [2], Zettnow [19], Lancereaux [5], Casares-Gil [20] modifiée par Levenson [4], Türner [13] et Imai [21] pour mettre en évidence les cils bactériens.

Cette solution argentique doit être également de préparation récente, son usage étant limité à huit à dix jours au plus. A la rigueur on peut effectuer l'imprégnation avec un liquide plus âgé : les résultats sont alors beaucoup plus variables et les flagelles se perçoivent souvent plus difficilement.

TECHNIQUE DE LA COLORATION. — Le mordant est porté, au moyen d'un petit entonnoir muni d'un papier filtre, sur la préparation. Nous recouvrons toutes les gouttes de l'émulsion microbienne, fixées sur la lame par simple dessiccation comme nous l'avons vu, avec la solution mordançante que nous laissons agir durant une minute à une minute et demie. Après lavage à l'eau distillée, nous effectuons l'imprégnation au nitrate d'argent ammoniacal. Dès que la préparation, qui brunit très rapidement, atteint une couleur « chocolat au lait » (entre cinquante à quatre-vingts secondes habituellement) nous lavons une dernière fois à l'eau distillée. Nous égouttons la lame en la secouant à plusieurs reprises, puis nous la séchons soit sur la platine chauffante, soit à l'étuve. Elle est alors prête pour l'examen.

RÉSULTATS.

Nous avons réussi, au moyen de notre technique, à colorer les cils de la plupart des souches de bactéries mobiles que nous possédons dans la collection de l'Institut d'Hygiène et de bactériologie de Genève, cultures mises obligeamment à notre disposition par notre maître, M. le professeur T. Reh. Parmi les microbes aérobies nous avons obtenu de belles préparations des espèces suivantes : *B. coli* (2 souches), *B. proteus vulgaris* (2 souches), *B. proteus* X 19, *B. pro-*

teus mirabilis, *B. paratyphi* A, *B. paratyphi* B (3 souches), *B. typhi* (2 souches), B. de Gärtner, B. d'Aertrycke, *B. psittacosis*, *B. pyocyaneus* (2 souches), B. de Morgan, *B. foecalis alcaligenes*, *B. janthinus*, *B. anthracoides*, *B. pseudo-anthracis*, *B. mesentericus vulgatus*, *B. subtilis*, *B. pseudotetani* de Tavel et *B. fluorescens liquefaciens* (2 souches). Parmi les anaérobies nous avons coloré les flagelles de *B tetani*, *B. sporogenes* et *B. botulinus* A.

Nous avons confronté les résultats obtenus par notre procédé en effectuant pour chacune des espèces citées plus haut une coloration de cils soit par la méthode de Van Ermengem, soit par celle de Nicolle-Morax, soit encore par celle de Casares-Gil, soit enfin par celle de Levenson. Or, à notre avis, notre technique présente des avantages appréciables sur les unes et les autres.

Elle demande, en effet, bien moins de temps que la coloration préconisée par Van Ermengem. Elle évite tout chauffage, ce qui n'est pas le cas pour la méthode de Nicolle-Morax. Elle réalise des préparations plus fortement colorées et où les cils ressortent plus nettement que dans la technique originale de Casares-Gil. Comme dans la modification apportée par Levenson à ce dernier procédé elle utilise, mais à froid, l'imprégnation argentique.

De plus, du fait de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution, et en raison de ce que toutes les manipulations s'effectuent sans chauffage, notre méthode n'exige aucun tour de main spécial et peut être employée avec les plus grandes chances de réussite, même par des débutants.

Toutefois, nous ne saurions trop insister sur la nécessité absolue de travailler avec un matériel d'une irréprochable propreté ; de n'user que de colorants fraîchement préparés et préalablement filtrés ; de suivre enfin, point par point, tous les détails techniques mentionnés, lesquels, si méticuleux et superflus qu'ils puissent paraître, assurent seuls un résultat parfait.

Le but que nous avons avant tout poursuivi a été non pas d'enrichir d'un procédé de plus la surabondante multiplicité

des méthodes de coloration des cils bactériens, mais bien d'apporter une technique à la fois facile et rapide permettant d'obtenir à coup sûr des préparations contenant une majorité d'éléments microbiens pourvus de cils nettement colorés et fournissant nombre de champs susceptibles d'être, le cas échéant, microphotographiés.

CONCLUSIONS.

1° Notre technique permet la réalisation de préparations bien colorées où les cils sont très nettement visibles ;

2° Elle présente l'avantage d'être exécutée, mordançage et imprégnation, à froid ;

3° Elle n'exige qu'un minimum de temps. Son exécution ne demande, pour autant que l'on ait toujours un matériel prêt à l'emploi, que trois minutes environ ;

4° Ses résultats sont plus constants que dans les méthodes les plus habituellement utilisées ;

5° Sa maniabilité est telle qu'elle assure un pourcentage élevé de succès même pour des débutants.

BIBLIOGRAPHIE

[1] PEPPLER (A.). *Z. f. Bakt.*, **29**, 1901, p. 345.
[2] VAN ERMENGEM (E.). *Trav. du Lab. d'Hyg. et de bact. de l'Univers. de Gand*, **1**, fasc. 3, 1893.
[3] TRIBONDEAU (L.), FICHET et DUBREUIL. *C. R. Soc. Biol.*, **79**, 1916, p. 710 à 716.
[4] LEVENSON (S.). Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 634.
[5] LANCEREAUX (E.). *La Presse Médicale*, 4 octobre 1919, p. 565.
[6] HESSERT (W.). *Z. f. Bakt.*, *Originale*, **16**, p. 346
[7] TÜRNER et DAVESNE. Ces *Annales* **41**, 1927, p. 1089.
[8] HINTERBERGER. *Z. f. Bakt.*, **27**, 1900 ; *ibid.*, **16**, 1901 ; *ibid.*, **30**, 1904.
[9] DE ROSSI (Gino). *Z. f. Bakt. Or.*, **33**, 1903, p. 572.
[10] ISIDA (M.). *Z. f. Bakt. Or.*, **142**, 1938, p. 480.
[11] TÜRNER (A. W.). *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 1057.
[12] BOWHIL (Th.). *Hygienische Rundschau*, n° 1, 1898
[13] WELCKE. *Arch. f. klin. Chir.*, **49**, fasc. 1, 1899.
[14] ARÉNA et SCHWARTZ. *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 500.
[15] BUNGE (R.). *Forts. d. Med.*, **12**, 1894, cahiers 12, 17, 24.

[16] Löffler. *Z. f. Bakt.*, **6**, 1889, p. 209 ; *ibid.*, **7**, 1890, p. 625.
[17] Nicolle et Morax. Ces *Annales*, **7**, 1893, p. 554.
[18] Rémy et Sugg. *Tr. lab. Hyg. et Bact. Univ. de Gand*, **1**, 1893, cahier 2.
[19] Zettnow (E.). *Deuts. Med. Woch.*, 8 mars 1906, p. 376.
[20] Casares-Gil. *Revista de Sanitad militar*, cf. Galli-Valerio, *Z. f. Bakt.*, 1915, p. 223.
[21] Imai (K.). *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1920, p. 474.

Le Gérant : G. Masson.

Imprimé par l'Ancne Imple de la Cour d'Appel, A. Maretheux, Dir., 1, r. Cassette, à Paris (France).

T. 63 OCTOBRE 1939 N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

VICTOR FRASEY

1869-1939

Notre collègue Victor Frasey a succombé le 19 août dernier. Il était né à Paris le 8 novembre 1869. En 1895, quatre ans après qu'il eut terminé ses études à l'Ecole vétérinaire d'Alfort, il fut désigné par Nocard à M. Roux et à M. Louis Martin pour collaborer à la production du sérum antidiphtérique. La direction de l'Institut Pasteur lui confia alors la station d'essais où devaient être soumises à des épreuves préalables les méthodes de préparation des sérums thérapeutiques chez les grands animaux.

Parallèlement à cette besogne pratique, qui absorba une grande partie de son activité, Frasey sut mener à bonne fin diverses recherches expérimentales et il réussit à mettre au point les techniques d'hyperimmunisation du cheval contre la bactéridie charbonneuse et contre le bacille du rouget.

Pendant la guerre, il s'efforça d'accélérer et d'accroître la production du sérum antidiphtérique et du sérum antitétanique. En 1920, Maurice Nicolle l'associa aux recherches qu'il

avait entreprises sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques, avec Debains et Nicolas.

Lorsque se manifestèrent les premiers signes de la maladie dont il devait mourir, Frasey se rendit compte de la gravité de son état. Néanmoins il continua courageusement à accomplir sa tâche jusqu'au jour où il dut s'avouer vaincu. Il fut alors nommé chef de service honoraire et se retira à Villeneuve-la-Guyard (Yonne) où il vient de s'éteindre.

L'Institut Pasteur rend hommage au zèle, à la conscience et au dévouement avec lesquels Victor Frasey contribua au développement de l'œuvre commune. Il conservera fidèlement le souvenir de ce bon collaborateur et des services éminents qu'il lui a rendus pendant près de quarante années.

LES ASPECTS ANATOMO-CLINIQUES D'UNE MALADIE DÉMYÉLINISANTE OBSERVÉE CHEZ LE SINGE LA LEUCO-ENCÉPHALOMYÉLOSE PÉRIVASCULAIRE CONFLUENTE

par Ludo van BOGAERT.

(*Jardin zoologique* [*Anvers*]. *Institut Bunge* [*Berchem-Anvers*].)

I. — Introduction.

Nous poursuivons, depuis quelque temps déjà, des recherches cliniques et anatomiques sur les *affections neurologiques spontanées* des singes. Nous nous sommes défendu expressément de les assimiler aux maladies décrites chez l'homme, à cause des déductions *étiologiques* qu'on pourrait être tenté d'en tirer. Cette réserve n'exclut pas l'intérêt qu'il y a de rapprocher certaines d'entre elles sur le plan *histopathologique* des affections connues chez l'homme. C'est précisément le cas des affections dont traite ce mémoire.

Le groupe que voici a été, en effet, à l'origine d'hypothèses multiples sur la pathogénie de la sclérose en plaques et de la sclérose diffuse. Nous n'en méconnaissons aucunement l'intérêt *théorique*, mais nous les considérons comme *injustifiées* et de nature à introduire dans l'étude des maladies des espèces animales et humaine des imprécisions nuisibles aux progrès de la neuropathologie comparée. Nées du besoin d'un groupement des maladies humaines, ce besoin s'est trouvé insuffisamment tempéré par cette notion que des formules histopathologiques même précisées avec les techniques les plus modernes, ne permettent aucune induction causale : nous serons ainsi conduits, par l'exposé même de ces faits, à prendre position au sujet de certaines analogies et classifications proposées.

Pour serrer les faits de plus près, il est indispensable de rappeler les étapes de nos connaissances sur ces maladies démyélinisantes, domaine où la diversité des noms proposés a encore contribué à semer la confusion.

En 1929, F. Schob présenta, pour la première fois, l'étude d'une affection singulière survenant chez l'orang-outang qu'il décrivit, très complètement en 1931 [1] sous le nom de « *sclérose disséminée confluente de la substance blanche du centre ovale chez le singe, combinée à une atteinte systématique des nerfs optiques, des racines et des cordons postérieurs* ». Il en rapportait deux cas, rappelait des cas antérieurs de Schrœder et discutait la relation du tableau morbide qu'il isolait avec les cas de Rothmann et Levaditi, Lépine et Schoen et Perdrau.

Le cas de Levaditi, Lépine et Schoen [2] fut présenté par ces auteurs comme une *cécité spontanée* à rattacher en tant qu'encéphalopathie au groupe de la sclérose diffuse. Ce premier singe de Levaditi, Lépine et Schoen était un *Macacus rhesus* (*Macacus rhesus*, 101) qui, au cours d'inoculation de Bi-métal, présenta de la cécité, tout en conservant un certain degré de perception lumineuse. L'examen oculaire, fait par M. Morax, montra une papille normale avec contraction pupillaire conservée, et, trois semaines plus tard, des papilles pâles, sans œdème, avec une contraction faible.

A l'autopsie, les auteurs notaient des lésions bilatérales et symétriques du centre ovale pariéto-occipital, à aspect de taches de démyélinisation irrégulières rappelant la sclérose disséminée. Ils distinguent, dans ces plages, deux types : un type récent en pleine phase évolutive avec corps granuleux, un type plus évolué, phase stabilisée à démyélinisation très avancée, à cellules étoilées, fibres névrogliques, presque sans corps granuleux. Les auteurs homologuaient cette affection à la maladie de Schilder-Foix, estimant que le virus atteignait le névraxe par voie vasculaire et, après enquête chez Hagenbeck et Chapman, ils estimaient que l'affection devait être très rare chez le singe.

En 1932, H. J. Scherer [3] apporta l'étude anatomique de 5 cas qu'il avait pu comparer aux coupes de 2 cas de Schob et établit, pour la première fois, l'analogie des lésions médullaires dans cette maladie, tant au point de vue de la localisation

des foyers que de leurs qualités histologiques, avec celles de la myélose funiculaire de l'homme. Cette même analogie existait pour les lésions médullaires du cas de Schob comme cet auteur l'admit ultérieurement. Il étendit cette analogie aux lésions cérébrales et optiques périphériques et confirma les données de Schob sur la participation du système nerveux périphérique (racines postérieures) à la maladie, soulignant combien ces localisations séparaient le processus observé chez le singe de celui décrit chez l'homme où elles sont exceptionnelles.

Ces travaux de Schob et Scherer n'ont pas retenu l'attention des observateurs de l'Institut Pasteur, car, en 1933, Levaditi [4, 5] apporta 2 cas nouveaux de la même affection sous le nom de « *cécité* spontanée *épidémique du singe* » avec G. Hornus et M^lle^ R. Schoen, sans tenir compte des publications de Schob et Scherer. Ces *Macacus rhesus* provenaient d'une épidémie d'amaurose spontanée observée à l'Institut sérothérapique de Milan par le professeur Belfanti.

Sur le premier de ces singes : peu de renseignements si ce n'est que les auteurs découvrirent une atteinte du tractus optique (nerf, chiasma et bandelettes) et notèrent l'intégrité des radiations optiques de Gratiolet. Le second (M. Rh. 598) présentait à nouveau une atrophie optique bilatérale (D^r^ M. Morax) et fut maintenu en vie pendant deux cent quatre-vingt-dix jours après le début probable de la maladie. Les auteurs y observaient une prolifération du conjonctif interstitiel du nerf optique et une démyélinisation irrégulière « en plaques » correspondant à des nids de corps granuleux. Le chiasma présentait la même lésion mais avec une certaine multiplication astrocytaire. Le reste de l'encéphale était normal. La moelle présentait dans toute son étendue une démyélinisation des cordons de Goll et de Flechsig. Les ganglions rachidiens présentaient une satellitose moyenne.

Ils considéraient que les lésions décrites représentaient trois stades d'un même processus, ceux-ci consistant en une atteinte des trois neurones visuels : le neurone périphérique, rétino-diencéphalique, diencéphalo-cortical, et éventuellement en une atteinte des cordons médullaires. Tout en indiquant l'analogie de ces maladies avec les affections humaines du système nerveux central, ils insistaient, cette fois, sur le fait qu'aucun de ces types ne saurait être identifié rigoureusement avec les types humains.

Des inoculations de *Macacus rhesus* 599 furent faites à

6 autres singes d'espèces différentes dont un seul montra des lésions, c'est le *Macacus rhesus* 603 de Levaditi, Hornus et Schoen. Il fut normal pendant quatre mois. A partir de ce moment, il devint hyperexcitable au toucher, se mit à tituber, mais ne présenta pas de troubles oculaires. Il mourut un mois plus tard. A l'autopsie macroscopique, les auteurs décrivirent des *foyers hémorragiques bilatéraux intéressant les noyaux gris centraux, les plexus choroïdes et la base de l'encéphale.* Ils séparèrent histologiquement des lésions aiguës et chroniques. Les foyers aigus semblaient d'origine vasculaires avec thromboses et infiltrations de polynucléaires, d'hématies et de corps granuleux. Les foyers anciens étaient frappants, disent les auteurs, par l'intensité de la démyélinisation. Les deux types de lésions se rencontraient dans le cortex, les lésions aiguës dans les noyaux gris centraux, les lésions chroniques dans le bulbe et la protubérance; les voies optiques, la moelle et les ganglions étaient indemnes.

Les auteurs admettaient l'existence d'un processus à deux phases : une phase initiale et une phase récente plus particulièrement évolutive, qui aurait causé la mort de l'animal, phase ayant, écrivent-ils, un « caractère récidivant » non sans analogie avec ce que l'on observe dans la sclérose en plaques. Ils crurent à la transmission de l'affection, dans le cas que voici, par un virus infravisible, mais prenant plus facilement chez des animaux du même type. Sur les 6 singes inoculés avec le matériel de *Macacus rhesus* 599, celui-ci fut cependant le seul à succomber.

Nous croyons d'*un point de vue strictement histopathologique* que les *conclusions* de ce travail de Levaditi, Hornus et Schoen méritent d'être *discutées*. En effet, *les lésions du Macacus rhesus* 603 *nous apparaissent*, d'après la description des auteurs, *comme tout à fait différentes de celles des Macacus rhesus* 598 *et* 599, malgré que les auteurs les considèrent comme un résultat d'inoculation positive à partir du matériel du *Macacus rhesus* 599 L'affection se présente ici macroscopiquement, comme une encéphalite à foyers hémorragiques dans les noyaux gris centraux et la base de l'encéphale. Les auteurs reproduisent dans leur note une figure de vaisseau thrombosé avec une paroi vasculaire infiltrée par des poly-

nucléaires. On voit les mêmes polynucléaires reproduits dans la deuxième figure, ici, au niveau de l'espace de Virchow-Robin. Le foyer chronique de démyélinisation qu'ils représentent comporte en outre une cavité nécrotique. Les auteurs reviennent à plusieurs reprises sur la présence d'éléments lipophores ou granulo-adipeux dont leurs reproductions montrent que ce sont des corps granuleux. Quant aux oligodendrocytes et aux cellules mésogliques, il est impossible de se prononcer à leur sujet. Le cervelet, la protubérance, la corticalité cérébrale, etc. présentaient également des lésions cavitaires et le nerf optique était intact. Les différences entre ces deux cas sont tellement évidentes qu'il est impossible de les comparer entre eux et ces deux affections n'ont rien à voir l'une avec l'autre au point de vue de leur histopathologie.

Le rapprochement avec la sclérose en plaques est basé, comme nous l'avons rappelé plus haut, par Levaditi et ses collaborateurs sur le « caractère récidivant » de la maladie. C'est là un point important et qui avait retenu l'attention dès notre première lecture. Déjà, dans leur note de 1930, Levaditi, Lépine et Schoen parlaient de « phases évolutives », mais à la lecture du protocole histopathologique, il s'agit, à l'évidence, ici, de stades d'âge différent. Dans le travail de 1933, comparant entre eux les 3 cas qu'ils ont observés, ils les considèrent comme représentant des phases différentes d'une même maladie, les 3 cas correspondant à des « stades successifs d'un même processus ». Ces stades représentent ici des différences d'extension : optico-chiasmatique, optico-diencéphalique, optico-calcarine, d'un processus qui « consiste en une démyélinisation systématisée, leuconévraxite optique à laquelle peuvent s'associer les fibres sensitives médullaires appartenant aux cordons de Goll et Flechsig ».

Ce « caractère récidivant » de la maladie, invoqué a priori, *par analogie avec la sclérose multiple, n'est nullement démontré par la coexistence de foyers d'âge différent pas plus que par l'incidence de cas à localisations différentes.*

Cette preuve ne sera apportée qu'en 1937 par H. J. Scherer [6] dans un travail issu de notre laboratoire où il montra pour la première fois l'existence, à côté de foyers récents, de foyers dont l'ancienneté peut être affirmée sur un ensemble

de critères histopathologiques. Le caractère allongé, linéaire des foyers, le rétrécissement visible de la circonvolution atteinte, leur constitution par un réseau de fibres gliales à orientation longitudinale, le caractère « piloïde » des rares noyaux astrocytaires, l'absence d'astrocytes fibrillaires en prolifération et de produits graisseux de désintégration permettent de les caractériser. La connaissance de tels cas permettra à l'avenir de rattacher au même groupe des observations où les lésions récentes feraient défaut et cette preuve a d'autant plus d'intérêt que le cas de Scherer (1937) était une surprise d'autopsie. *Cette coexistence de foyers frais et de foyers éteints depuis longtemps permet d'affirmer le caractère physique de la maladie et implique l'existence de cas guéris.*

Dans ce même travail, H. J. Scherer revint, à la suite de Ch. Davison, sur l'unicité des formes médullaire, cérébrale et optique et, pour mieux marquer à nouveau leurs relations avec la myélose funiculaire, il proposa pour les cas purement cérébraux le terme de « *leuco-encéphalose confluente* ».

A l'exception du travail de F. Schob, qui comporte, surtout pour le second de ces cas, de nombreux détails cliniques, les travaux publiés jusqu'à présent sur cette maladie n'apportent pas de *données séméiologiques précises*. L'objet de ce travail est de combler cette lacune. A l'appui d'un nombre assez important d'observations nouvelles (12 cas), dont plusieurs suivies pendant des années, nous tenterons de dégager les *aspects anatomo-cliniques de la maladie*. L'existence de cas « inapparents », qui ne se diagnostiquent qu'à l'autopsie, et l'*unicité de diverses formes optique, cérébrale et médullaire*, trouveront, dans cette série, leur confirmation. Nous montrerons que *la maladie peut s'observer chez les singes inférieurs*. Un de nos cas méritera quelques commentaires histopathologiques.

II. — Observations personnelles.

L'examen clinique des singes en captivité est difficile, surtout s'il s'agit d'animaux récemment arrivés et que l'observateur n'a pas eu l'occasion ou le loisir d'apprivoiser. L'appréciation des réflexes tendineux et cutanés est, à ce point de

vue, des plus délicates. Nous nous sommes borné dans les cas suivants à observer chez nos animaux, où une affection neurologique était soupçonnée : les mouvements spontanés à terre et aux barreaux, le grimpement, le saut, les mouvements de préhension des quatre membres, le tonus de soutien, le tonus musculaire passif, le tonus de la queue et, comme il s'agissait d'animaux relativement petits et maniables, les réflexes de redressement. Nous tenons à remercier ici, une fois de plus, M. De Vooght et ses collaborateurs si dévoués du Zoo, qui nous ont aidé, non sans risques, dans ces examens.

1° Groupe des Cercopithèques.

Nos deux premières observations concernent deux *Macacus rhesus* utilisés dans des recherches expérimentales sur les lésions du besoin d'oxygène chronique et aigu, que nous avions en cours avec MM. Dallemagne et Wegria. Sur 6 *Rhesus* en expérience, 2 ont présenté à l'autopsie des lésions d'une ancienne affection démyélinisante. Or, ces deux animaux avaient, avant d'avoir été choisis, fait l'objet d'un examen neurologique de routine qui n'avait rien révélé de particulier. En présence de ces constatations d'autopsie, nous avons interrogé plus minutieusement le garçon de laboratoire qui les surveillait, en dehors de nos expériences. Nous avons appris alors que l'un d'eux (*Macacus rhesus I* 424/36) avait présenté, pendant son séjour au laboratoire de Pharmacologie, des phénomènes très particuliers. On assista, au moins dix mois *avant* son intoxication, à deux crises, qui durèrent moins d'une heure et qui consistaient en convulsions de quelques minutes, suivies d'une période d'adynamie pendant laquelle l'animal était couché sur le côté et prostré. Personne de nous n'a assisté personnellement à ces manifestations qui se sont produites tôt le matin ; le préparateur, seul, en a été témoin. Nous n'en avions pas tenu compte à cause de leur ancienneté et du fait que les phénomènes n'étaient plus apparus depuis longtemps au moment où nous avons commencé l'intoxication aiguë.

Voici l'observation histologique de ce cas :

Macacus rhesus I (424/36). — Une première coupe passe par le plein développement du *locus niger* et du *gyrus centralis*. On voit une grande

nappe de démyélinisation centrolobaire : nappe constituée par une multitude de foyers de démyélinisation périvasculaire dont plusieurs s'orientent parallèlement aux fibres issues du centre ovale (fig. 1). Ce foyer occupe l'axe blanc du *gyrus centralis anterior*. Ces foyers diminuent d'importance vers le point de jonction de l'axe de ces deux circonvolutions sans disparaître toutefois puisque, à un plus fort agrandissement, on les retrouve sous forme de petites lésions juxta-vasculaires



FIG. 1 *a*. — *M. rhesus* (424/36). Lésions typiques débutantes de la région pariétale (Spielmeyer).

dans l'axe blanc du *gyrus centralis posterior*. L'écorce et les noyaux gris centraux sont intacts.

Une coupe plus postérieure intéresse la région occipitale (fig. 2). Elle passe par le plein développement de la scissure calcarine. Les plus grosses lésions s'observent ici dans la substance blanche qui borde le gyrus lingual, au fond du sillon calcarin. Le foyer de démyélinisation suit cette zone de l'écorce jusqu'au niveau où elle se continue avec l'écorce du coin. A la face externe de ce lobe, les lésions s'étendent en dessous du tiers moyen du *gyrus occipitalis superior*. Elles ont pour limite extrême en bas le niveau correspondant au fond du sillon occi-

pital inférieur et en haut un niveau correspondant au fond du sillon pariéto-occipital interne. Dans cette vaste plage de démyélinisation, qui atteint presque toute la substance blanche occipitale (fig. 3), on distingue une partie centrale et une partie périphérique constituée d'une série de foyers linéaires allongés, le long des vaisseaux plongeant parallèlement dans les fibres en U.

Les coupes par la méthode de Holzer montrent que les zones de



FIG. 1 *b*. — *M. rhesus* (424/36). Images gliales équivalentes (Holzer).

démyélinisation sont le siège d'une gliose anisomorphe dense, tant au niveau des régions occipitales que frontales.

Dans l'hémisphère droit, le foyer s'étend en dessous du *gyrus marginalis*, *centralis anterior et posterior*. Il respecte la capsule externe, touche à l'extrémité supérieure du putamen et quelques lésions s'observent dans le contingent des fibres du *gyrus cingulatus*. Le corps calleux, le fornix, les noyaux gris centraux sont indemnes. Les coupes cytologiques dessinent elles aussi les foyers dans la substance blanche tels qu'ils ont été décrits plus haut et confirment l'intégrité de l'écorce.

Sur les coupes au Nissl, en observant de plus près ces foyers de démyélinisation, on peut distinguer dans ceux-ci trois sortes de foyers : 1° dans les lésions de la substance blanche, la réaction gliale est constituée par une augmentation des microgliocytes auxquels s'ajoutent des cellules,

à plus gros noyaux pâles, à protoplasme légèrement rosé et appartenant à l'astroglie ; 2° dans la zone des fibres en U, on trouve à ce niveau au moins en certains points des bandes de cellules gliales, rubannées rappelant les cellules conjonctives (éléments piloïdes) et des éléments en bâtonnets. La présence voisine d'un vaisseau permet de les comparer et de les distinguer des cellules conjonctives ; 3° dans les foyers qui touchent à la substance grise, qui mordent sur elles, par



FIG. 2a. — *M. rhesus* (424/36). Lésions dans l'axe blanc occipital.

exemple dans le dôme du *gyrus centralis anterior*, on observe non seulement une augmentation des satellites périneuronaux, de la glie intracorticale diffuse, mais les groupes isogéniques sont plus nombreux, et on voit en outre de grands noyaux clairs à protoplasme métachromatique appartenant vraisemblablement à la macroglie.

Dans aucune de ces formations, on ne voit au Nissl de macroglie protoplasmique, ni de nombreux corps granuleux, ni de la glie engraissée. Les vaisseaux ne montrent pas de lésions, c'est à peine si à quelques endroits on voit, au voisinage d'un vaisseau, une bande de cellules gliales à laquelle s'ajoutent de rares plasmatocytes. On ne voit nulle part de périvascularites vraies. Dans la région occipitale, au centre même des

foyers, on voit des régions plus pauvres en cellules et ponctuées seulement par quelques éléments à cytoplasme mal visible, à gros noyaux, où ces cellules sont groupées deux par deux.

Sur les coupes occipitales, par la méthode de Scarlach, on observe de nombreux corps granuleux chargés de débris graisseux dont quelques-uns se retrouvent dans les espaces périvasculaires. Les corps granuleux sont par contre peu nombreux eu égard à l'importance des foyers lésionnels, dans les régions centrales.



Fig. 2 *b*. — *M. rhesus* (424/36). Images gliales équivalentes. Cette image montre que les lésions gliales sont plus importantes que ne le ferait prévoir l'image myélinique.

Le sixième singe de cette série n'avait présenté cliniquement pendant la vie aucun signe de cécité. Il est vrai qu'on n'avait pas examiné le fond de ses yeux. Or, à l'autopsie, on découvrit une maladie démyélinisante spontanée du chiasma.

Voici l'observation histologique de ce cas.

Macacus rhesus II (109/37). — Sur une grande coupe myélinique intéressant les noyaux gris centraux (région antérieure), la région tubérienne et l'épanouissement des bandelettes optiques, avec un segment

dorsal du chiasma, on voit aussitôt la présence de deux bandes de démyélinisation occupant le centre des bandelettes optiques (fig. 4). Elles commencent en dehors, dans une région de la bandelette répondant à la moitié interne du pied du pédoncule, elles deviennent de plus en plus importantes au fur et à mesure qu'on se rapproche du chiasma pour dominer d'importance au moment d'entrer dans celui-ci. Vers le milieu du trajet de la bandelette, ce foyer occupe la moitié de la largeur de celle-ci, laissant de part et d'autre un quart des fibres bien imprégnées. La démyélinisation est maximale au centre du foyer, elle



FIG. 3. — *M. rhesus* (424/36). Lésions importantes de la région calcarine (Holzer).

diminue progressivement vers les bords. La lésion est symétrique, mais elle est plus importante à gauche. Dans le chiasma même, les lésions se retrouvent dans les fibres les plus médianes du plan commissural, mais elles sont certainement moins importantes.

Les coupes cytologiques au Nissl donnent l'image négative des préparations précédentes (fig. 5). On voit dans les deux bandelettes une zone infiltrée, où on reconnaît aussitôt un certain nombre de noyaux macrogliques allongés dans le sens des fibres, et dans le voisinage des vaisseaux, dont la paroi montre encore quelques réactions, des cellules neurogliques engraissées, des corps granuleux variés et des plasmatocytes. Les préparations au Scarlach montrent une infiltration soudanophile extrêmement nette des éléments vecteurs dans toute l'étendue des deux foyers.

La dégénérescence de la bandelette est du type fasciculaire. Elle se

présente sur les coupes myéliniques d'une manière diffuse à bords flous, avec accentuation périvasculaire. La prolifération gliale se fait surtout aux dépens de la neuroglie engraissée. La désintégration graisseuse est



FIG. 4. — *M. rhesus* (109/37). Double lésion optique et chiasmatique dans une forme purement oculaire de la maladie (Spielmeyer).

du type fixe : de nombreuses granulations graisseuses sont parsemées dans le champ de la zone dégénérée, on ne voit aucun corps granuleux même au voisinage des vaisseaux : ici aussi, les graisses s'accumulent en bandes de fines gouttelettes. L'organisation gliofibrillaire est diffuse et modérée.



FIG. 5. — *M. rhesus* (109/37). Vue des foyers au Nissl.

Chez cet animal, les lésions de démyélinisation sont localisées exclusivement au chiasma, le cerveau et la moelle sont intacts

Notre troisième observation concerne une femelle (*Macacus rhesus* III [41/35]) entrée au Jardin zoologique en mars 1934. En mars 1935, on constata que les mouvements étaient très maladroits, qu'elle était très peureuse, irritable et solitaire. Peu de jours après, elle était aveugle (fig. 6). Elle n'a jamais présenté de crises d'épilepsie. La cécité a persisté pendant une vingtaine de jours et elle fut trouvée morte, un matin, dans sa cage. L'examen neurologique n'avait rien montré de particulier, mais l'examen ophtalmologique que le Dr Bauwens a

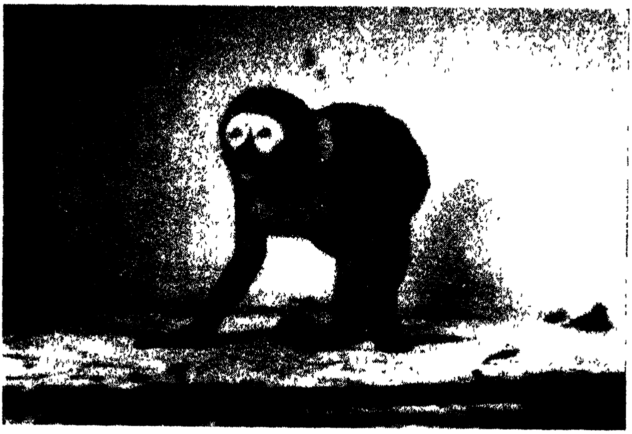


FIG. 6. — *M. rhesus* (41/35). Cécité simple sans parésie.

bien voulu pratiquer montre une *atrophie papillaire bilatérale*, avec une très faible contraction du sphincter pupillaire à la lumière.

Voici l'observation histologique de ce cas :

Macacus rhesus (41/35). — L'autopsie a montré que l'animal est mort de tuberculose généralisée. La moelle a été très minutieusement examinée à tous ses niveaux (au Spielmeyer, Scarlach, Nissl) et ne présente aucune altération.

Le bulbe moyen, la protubérance, le pédoncule cérébral au niveau du niveau rouge, une grande coupe passant par la région frontale, une autre intéressant la région temporale, une grande coupe intéressant le lobe occipital ne montrent aucune altération myélinique. Par contre, sur une coupe transversale, passant par la région du tuber, touchant le plein développement de la bandelette optique et la partie postérieure du chiasma, on voit que la bandelette est le siège d'un foyer de démyélinisation allongé et atteignant son plus grand développement,

dans le tiers moyen de celle-ci. La lésion diminue d'épaisseur vers la partie postérieure de la bandelette et aussi vers le chiasma. L'épanouissement du pédoncule cérébral, la capsule interne et les noyaux gris adjacents sont intacts. Cette lésion n'a pas de bords tranchés, ses limites vers l'extérieur sont peu précises. Les différentes coupes du cerveau ne montrent aucune altération ni de la substance grise ni de la substance blanche.

Sur les coupes au Nissl, l'infiltration de la bandelette optique est surtout constituée de cellules microgliales et de « *gemästete* » *glia*. Ses grandes cellules gliales, à noyau clair, à réseau chromatinien extrêmement fin, sont allongées dans le sens des fibres. Elles sont dispersées dans toute l'étendue de la bandelette optique sans prédilection juxtavasculaire. Sur les coupes traitées au Scarlach, on est aussitôt frappé de la richesse de la bandelette en grains d'un beau rouge brillant. A un plus gros agrandissement, on reconnaît une accumulation extrêmement dense de corps granuleux au stade soudanophile et dispersés dans toute l'étendue de la bandelette. Les images au Nissl comme les images au Scarlach montrent que la dégénérescence dépasse en étendue le territoire indiqué sur les préparations myéliniques.

Le chiasma lui-même est le siège, dans sa partie ventrale, d'une prolifération gliale très dense faite d'éléments fusiformes allongés (g. piloïde) et de macroglie engraissée. Dans les bandelettes optiques, on retrouve la même dégénérescence fasciculaire, mais la désintégration graisseuse est beaucoup plus intense. Le champ est bourré de gouttelettes de graisse ayant pris le Scarlach, on retrouve çà et là un corps granuleux typique. La destruction myélinique est importante, les axones présentent des signes de lésions.

Ici encore nous sommes en présence d'une *forme purement optique* de la maladie sans participation du cerveau et de la moelle, malgré que l'animal soit mort brusquement et sans que rien ait pu permettre de prévoir son décès. Nous avons observé cet animal en pleine cécité, pendant trois semaines. Deux fois avant la mort, il a été réexaminé au point de vue neurologique. Si nous n'avions pas su à ce moment qu'il avait été aveugle, rien dans son comportement ne nous aurait fait soupçonner une lésion des voies optiques.

Il en est de même dans l'observation IV où le contrôle fait défaut, mais où l'animal a été suivi pendant six mois.

Il s'agissait d'un grand *Rhesus* de quatre ans et demi qui devint aveugle, brusquement, en mars 1936, sans avoir présenté aucune affection intercurrente. Cet animal, apprivoisé, circulait librement dans l'appartement de sa maîtresse, s'est mis brusquement dans la matinée à *frissonner, sans crise d'épilepsie, sans perte de conscience, sans sommeil post-paroxystique* et au bout d'une dizaine de minutes quand il voulut se remettre en mouvement on constata qu'il se heurtait aux objets et aux meubles. Les jours suivants, il fit deux crises épileptiques

et devint plus *difficile* et *irritable*. L'examen neurologique était négatif. Le fond d'œil (Dr Bauwens) montra une *atrophie papillaire débutante avec un léger œdème péripapillaire, au niveau du segment nasal des deux papilles*. Deux mois plus tard : atrophie papillaire blanche bilatérale (Dr Bauwens). Cet animal a été revu six mois plus tard. L'atrophie persistait également typique, mais l'animal n'en paraissait plus incommodé. Il mourut d'une affection pulmonaire aiguë et l'autopsie ne put être effectuée.

Notre observation V concerne également un *Macacus rhesus* adulte.

Macacus rhesus V (163/38), mâle de quatre ans. — Arrivé au Zoo en mars 1931.

Nous avons constaté le 3 avril 1938 une démarche ébrieuse avec



Fig. 7 — *M. rhesus* (41/35). Hémiparésie prédominant sur le membre inférieur droit.

grossière dysmétrie aux quatre membres. Ce singe ne présentait pas de déficit moteur, pas de cécité, pas d'épilepsie

Nutrition apparemment normale, selles bonnes.

Du 5 au 25 avril, les troubles s'aggravèrent Il s'y ajouta une *parésie prédominant sur les membres droits* (fig 7). Quand il sautait ou qu'il s'accrochait aux barreaux, la force de préhension de la plante des pieds et de la paume des mains était franchement diminuée.

La force des muscles proximaux était conservée. La queue avait ses mouvements normaux. L'animal se rendait compte de cette parésie parce qu'au lieu de prendre sa nourriture avec les mains il se couchait et la prenait directement avec la bouche. En plongeant vers un fruit, il lui arrivait fréquemment de culbuter par-dessus la tête.

Ce *mélange d'hypermétrie* et de *parésie* lui faisait également manquer ses buts de saut. L'expression de la face était déprimée et douloureuse. Amaigri considérablement, il ne toussait cependant pas. La langue était sèche. La quantité d'urine émise n'était pas abondante

Les réflexes pupillaires étaient normaux. Le réflexe tendineux des

membres inférieurs et supérieurs semblaient affaiblis. Pas d'atrophies grossières. Du 28 avril au 10 mai, la situation resta stationnaire et l'état de nutrition de l'animal restait assez bon. La force de préhension restait toujours très diminuée des deux côtés. Les réflexes tendineux étaient affaiblis mais non abolis. Revu le 13 mai dans un état de dénutrition marquée.

L'affection débuta ici par une dysmétrie grossière des quatre membres, précédant la parésie. L'évolution dura six semaines.



Fig. 8. — *M. rhesus* (163/38). Lésions débutantes du centre ovale (Nissl).

Nous n'avons pas observé de troubles visuels. Le fond de l'œil n'a pas été examiné.

Voici l'observation histologique de ce cas :

Les lésions présentent la *symétrie* et la *localisation typiques* de l'affection. Elles atteignent la substance blanche des deux centres ovales avec le tiers supérieur de la capsule interne, et respectent le corps calleux, la circonvolution supracalleuse et les lobes temporaux. Toute la substance grise — écorce, noyaux gris centraux — est exempte de lésions à tous les niveaux. Les fibres en U, généralement respectées, contiennent toutefois un certain nombre de petits foyers.

Les lésions atteignent leur plus grande extension et intensité au niveau pariétal, suivant ensuite les lobes occipitaux, et, en dernier lieu,

les lobes frontaux, ou on ne trouve encore que des petits foyers périvasculaires largement séparés les uns des autres par de la substance blanche normale (fig. 8 et 9). Quant à la qualité des lésions, celle-ci varie suivant le niveau examiné. Au niveau pariétal, il s'agit de bandes périvasculaires de prolifération macrogliale. On y trouve les formes connues de macroglie protoplasmique à larges noyaux clairs, et on observe, dans les Holzer, une légère tendance à formes des fibres gliales.

Par contre, au niveau pariétal, on ne rencontre presque plus de foyers circonscrits, mais une large plage confluente de démyélinisation aux

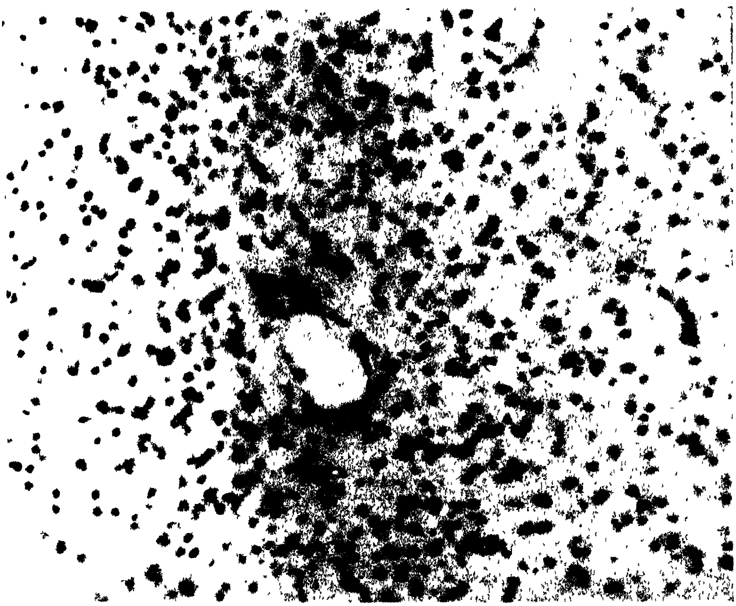


FIG. 9. — *M. rhesus* (163/38). A un plus gros agrandissement, on voit que ce sont des couronnes macrogliales autour d'un vaisseau du centre ovale (Nissl).

bords flous (fig. 10 *a*, *b* et *c*) et dominée par une prolifération cellulaire extrêmement intense. Celle-ci se compose d'astrocytes proliférés, et, en partie, fibrillaires, et — en plus grande partie — de corps granuleux bourrés de graisses. Le caractère périvasculaire des lésions, si nettement visible au niveau frontal, tend à être effacé, ici, par la confluence des foyers. Pourtant, on retrouve au bord des grands foyers un certain nombre de lésions nettement périvasculaires.

Les voies optiques périphériques ne contiennent ni foyers, ni démyélinisation systématique ou plus diffuse. Pourtant, les Scarlach montrent une très légère désintégration graisseuse, encore fixe, dans les parties latérales du chiasma.

La moelle épinière, examinée à de nombreux niveaux et avec différentes techniques, ne présente aucune lésion appréciable.

Les faisceaux de la queue de cheval sont exempts de lésions.

Notre première observation chez *Cercopithecus ascagnus* remonte à 1934. Elle fut prise avec un soin particulier parce que c'était la première fois que nous observions, dans cette espèce de singes, la *paraplégie en extension* typique qui caractérise, dans certains cas, cette variété de myélose funiculaire.



FIG. 10*a*. — *M. rhesus* (163/38). Lésions typiques étendues de la zone pariéto-frontale et du centre ovale des deux côtés (Spielmeyer).

Cercopithecus ascagnus VI (330/34), mâle de quatre ans — Vers le 7-8 novembre 1934, on remarque que l'animal, ordinairement vif et agile, a peine à mouvoir la patte gauche. Il s'en sert difficilement, ne saute plus et quand il progresse on remarque que la patte arrière droite manque aussi de solidité. Il ne se nettoie plus : la patte reste paralysée, souillée de matières fécales et de sciure de bois.

Le 14 septembre 1934 : la paralysie des deux jambes et pieds est déjà complète, la cuisse droite est encore mobilisable mais péniblement. Il saute quand on le touche et se retire à la piqûre d'épingle.

Le 18 septembre 1934 : la *paraplégie s'étend à tout l'arrière-train* qui commence à maigrir. Les poils sont secs, mêlés, salis de détritus, les

phalanges des orteils étendues sur le carpe, le pouce en adduction, les orteils tendent à se replier dans la plante du pied.

Il n'avance plus qu'en se traînant avec les membres antérieurs qui ont conservé toute leur vivacité.

Le 24 septembre 1934 : la situation est aggravée. La paralysie avec atrophie musculaire s'étend aux muscles du bassin, des membres et même aux parties les plus inférieures de la colonne vertébrale. Quand



FIG. 10 *b*. — *M. rhesus* (163/38). Leurs équivalences gliales (Holzer). Les mêmes coupes montrent les lésions du chiasma et des bandelettes.

l'animal se redresse ou essaye de s'asseoir, il y a une *lordose lombaire anormale*.

Vers le 10 décembre 1934 apparaît une modification dans le caractère de la paraplégie. *A la paraplégie très rigide en hyperextension, avec extension des pieds en varus équin, avec hyperflexion des phalanges digitales dans la plante, avec hyperextension de la jambe sur la cuisse, de la cuisse sur le bassin, se substitue une contracture en flexion* (fig. 11).

Le pied demeure en varus équin, la cuisse est repliée sur le bassin,

la jambe sur la cuisse et les deux membres sont en adduction nette. La queue est flasque et n'est plus relevée au pincement.

Par cette modification dans le caractère de la paraplégie, l'animal parvient à s'asseoir. La lordose lombaire est aussi moins marquée quand il se traîne ou qu'il s'assied. Les mouvements volontaires et les réflexes tendineux des membres inférieurs sont abolis. L'amyotrophie des membres inférieurs et des muscles de la ceinture pelvienne s'accentue lentement.

Le *pincement* des membres inférieurs *est moins bien ressenti* qu'aupa-



FIG. 10*c*. — *M. rhesus* (163/38). Lésions typiques de la région pariéto-occipitale (Spielmeyer).

ravant : l'animal ne relève plus les membres quand on le pique, ou qu'on le touche avec un objet très chaud. La recherche du signe de Babinski est impossible tant l'animal se débat.

Le 21 décembre 1934 : état stationnaire. Il ne mange plus et s'affaiblit rapidement.

La contracture ne s'est plus modifiée.

Il ne réagit plus quand on lui pique la fesse ou la cuisse.

Les membres supérieurs, la nuque, le dos, le ventre ont leur activité normale. *Il urine difficilement, souvent, par petites quantités. Incontinence pour les matières fécales.*

Le 24 décembre 1934 : on le trouve mort dans sa cage à 8 heures du matin.

Chez cet animal adulte se développa, en deux mois, une paraplégie progressive d'abord en hyperextension, puis en flexion avec amyotrophie. Rapidement, elle s'accompagna de



FIG. 11 *a*. — *C. ascagnus* (330/34). Attitude au début de la maladie, la queue pend flasque, les membres inférieurs sont en demi-flexion-adduction, ils commencent à maigrir, l'animal est encore alerte.

troubles sensitifs et à la fin de troubles sphinctériens (?) Les membres supérieurs, l'extrémité céphalique conservèrent jusqu'au bout une mobilité et une sensibilité intactes. Le psychisme ne fut pas modifié. Les réflexes pupillaires étaient

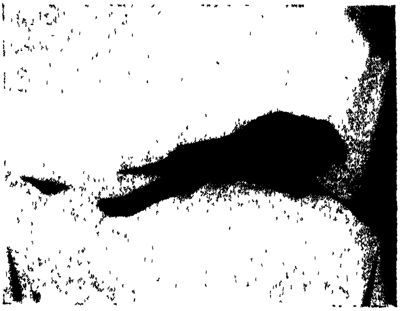


FIG. 11 *b*. — *C. ascagnus* (330/34). Deux semaines plus tard, il progresse en se traînant sur le côté, grâce à la force musculaire conservée dans les membres supérieurs.

conservés. L'animal ne présentait cliniquement aucun signe de cécité.

Le protocole histologique de ces cas est malheureusement incomplet à cause du mauvais état où se trouvaient les organes quand l'autopsie a pu être pratiquée. La moelle était inutilisable. Dans le centre ovale, on retrouvait les foyers de réaction macrogliale périvasculaire répondant aux foyers jeunes des autres cas, mais le caractère des lésions de putréfaction rendait leur analyse fine impossible. Ils occupaient la localisation habituelle sous le *G. frontalis anterior*.

Dans un autre bloc, dont la fixation était meilleure, on trouvait, dans



Fig. 12*a*.



Fig. 12*b*.

Fig. 12*a* et *b*. — *C. ascagnus* (79/35) Attitude superposable à celle du cas précédent, l'adduction-extension des membres inférieurs s'accompagne ici d'un varus équin paralytique très bien visible.

différents segments des deux bandelettes optiques surtout à l'extrémité latérale, des foyers fort denses et irréguliers. La zone la plus proche de la ligne médiane était plus infiltrée dans son centre, tandis que la zone latérale était infiltrée dans sa totalité.

Dans ce cas, malheureusement abîmé, les lésions optiques sont certaines, celles des centres ovales sont probables. La

moelle était inutilisable. Cette lacune est moins grave que nous ne le pensions tout d'abord, car le cas suivant est tout à fait superposable au précédent et ici l'autopsie fut pratiquée dans de bonnes conditions.

Cette seconde observation date du début de 1935. L'évolution clinique fut analogue à la précédente.

Cercopithecus ascagnus VII (79/35), mâle de quatre ans et demi. — Est au Zoo depuis un an et demi. L'animal commence à traîner la patte droite le 20 janvier 1935, le lendemain la patte gauche est atteinte à son tour, puis la cuisse gauche. Les nerfs, les deux membres inférieurs sont *paralysés*. A la palpation, ils sont *rigides*. Leur *extension* est réductible. *Les réflexes tendineux sont considérablement exaltés* (fig. 12 *a*).



FIG. 13. — *C. ascagnus* (79/35). Lésions massives détruisant presque toute la bandelette optique avec centre nécrotique (Spielmeyer).

Les membres supérieurs restent indemnes. La tête est bien mobile. Les réflexes pupillaires sont conservés.

Cet état reste stationnaire pendant une quinzaine de jours.

Les premiers troubles remontent à la première semaine de janvier 1935.

La marche est peu assurée à cause d'une certaine gêne dans les membres inférieurs. Le corps oscille du fait de cette incertitude. Les mouvements de flexion sont bientôt moins souples.

Les membres supérieurs restent vigoureux, l'appétit n'est pas modifié. Avec les pattes antérieures, il s'accroche aux barreaux et parvient encore à grimper en laissant pendre derrière lui les membres inférieurs. Cette paraplégie en extension ne s'accompagne pas de clonus, ni de signe de Babinski.

Le 23 février 1935, à un nouvel examen, on constate une diminution de la sensibilité à la piqûre au niveau des membres inférieurs des deux côtés. Il mange et boit normalement.

Les membres supérieurs et la tête sont indemnes.

Le fond de l'œil, examiné le 24 février 1935, présente un aspect

d'atrophie optique plus avancée que dans le cas précédent (Dr Bauwens) *et bilatérale. L'animal ne paraît cependant pas aveugle.*

Les réflexes pupillaires sont un peu plus lents qu'habituellement.

Cet animal semble plus incommodé que le précédent de sa paraplégie (fig. 12 *b*).

Les selles sont plus difficiles, mais il n'y a pas de troubles sphinctériens.

L'exposition aux radiations ultra-violettes avec un régime riche en vitamines A, B, C ne modifie pas son état.

Il fut sacrifié le 26 mars 1935.

L'évolution de la maladie couvre également un peu moins de deux mois. L'animal a été sacrifié avant la mort spontanée.



Fig. 14. — *C. ascagnus* (79/35). Très fines lésions de démyélinisation débutant dans l'axe blanc pariétal (Spielmeyer).

Il n'a pas fait de paraplégie en flexion terminale. L'atrophie optique ne s'accompagnait d'aucun signe clinique de cécité. Ce cas présente la triple localisation classique des lésions.

Les *bandelettes optiques* présentent une lésion ancienne symétrique, constituant de véritables foyers de ramollissements en voie de transformation microkystique (fig. 13).

Le *cerveau*, par contre, présente des lésions débutantes occupant à nouveau la partie du centre ovale sous-jacente au lobule pariétal (fig. 14).

La substance blanche au niveau du *G. marginalis* présente une série de foyers visibles déjà à l'œil nu. Ce sont des foyers de prolifération macrogliale périvasculaire. Une prolifération identique, moins nette et plus diffuse, s'observe sous la coupole de *G. centralis posterior.* Les vaisseaux axiaux du *G. centralis posterior* sont légèrement infiltrés.

Le centre ovale ne présente pas de gros foyers à gauche, toutefois sous

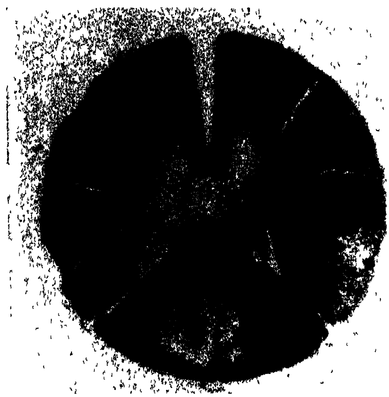


FIG. 15*a*. — *C. ascagnus* (79/35). Lésions médullaires typiques au niveau cervical.

le *G. centralis anterior* et *posterior* on voit de minuscules foyers aussi typiques au Nissl qu'au Spielmeyer. Les régions occipitales, temporales et préfrontales ne présentent pas de lésions nettes.



FIG. 15*b*. — *C. ascagnus* (79/35). Lésions médullaires typiques au niveau dorsal inférieur.

Ces foyers jeunes, très petits, à démyélinisation intense, mais incomplète et à bords flous, sont très caractéristiques

de la maladie et se voient ici d'une manière absolument nette.

La moelle montre une myélose funiculaire très avancée, dont la gravité des lésions contraste avec l'intégrité des racines et des nerfs de la queue de cheval.

Au niveau de la moelle cervicale (fig. 15 *a*), on trouve seulement de petits foyers, d'aspect spongieux et non encore confluents dans les cordons postérieurs, des foyers encore plus jeunes dans les cordons latéraux.

La moelle dorsale inférieure (fig. 15 *b*) offre de graves altérations des cordons postérieurs et latéraux, sous forme d'importants foyers spongieux, le plus nettement dans la moitié dorsale de ces formations. Les cordons antérieurs présentent eux aussi quelques foyers plus petits.

La moelle lombo-sacrée ne montre qu'une dégénérescence pyramidale secondaire.

Dans l'ordre histologique, les lésions les plus anciennes sont celles des bandelettes optiques, puis viennent celles de la moelle et enfin celles des centres ovales dont le caractère récent n'est pas douteux. La paraplégie en extension aurait succédé à l'amaurose : de celle-ci nous n'avons vu que les séquelles sous forme d'une double atrophie papillaire.

Aux deux cas précédents, se rattache une observation de paraparésie du même type, mais ayant évolué vers la guérison. Ce singe est toujours en observation depuis trois ans.

Cercopithecus petaurista VIII, mâle de trois ans. — Se trouve au Zoo depuis le mois de juin 1935. En août 1936, l'animal a présenté d'abord une parésie légère des membres inférieurs qu'on attribuait à une chute.

Examiné le 10 août 1936, nous notions une *parésie de l'arrière-train avec flaccidité de la queue*. Les réflexes tendineux étaient conservés, les réflexes cutanés plantaires n'étaient pas inversés, la sensibilité tactile etait normale.

L'animal était cependant plus *somnolent*, se laissait examiner trop facilement. Les muscles ne présentaient pas d'atrophie, pas de modifications du tonus. Il n'y avait pas de troubles sphinctériens.

Ce singe fut très étroitement surveillé depuis cette époque jusqu'au mois de novembre 1936. Les troubles moteurs atteignirent leur maximum au mois d'octobre 1936.

Voici le protocole d'un examen fait le 8 octobre 1936 :

« Le saut est impossible. L'animal tient très mal sur le perchoir et quand il se bat avec d'autres Cercopithèques, il tombe fréquemment sur le côté surtout à droite. Les mouvements de préhension de la queue si effectifs chez ces singes ont disparu. Les réflexes tendineux sont conservés. Les réflexes cutanés plantaires sont indifférents. »

Les réflexes de retrait de la queue au pincement ont reparu le 20 octobre. Le fond de l'œil est normal. L'état s'améliore cependant et

le 11 décembre 1936 nous notions qu'en dehors d'une très légère parésie des membres inférieurs on ne remarque plus rien. Si l'animal n'était pas encadré par d'autres animaux neufs, qui ont toute leur vivacité, il serait impossible d'affirmer avec certitude qu'il a été malade. Le fond de l'œil est normal. On l'a remis dans la cage commune, le 15 janvier 1937 et il fut suivi depuis cette époque. Nous l'avons réexaminé à fond le 11 août 1937.

On remarque qu'à la marche l'adduction des jambes chez cet animal est plus considérable que chez les autres animaux de la même race.

Depuis quinze jours, il présente une maladie cutanée, une sorte d'*alopécie* en aires irrégulières, survenant au niveau de la queue, des pattes et de l'arrière-train et *dont la limite supérieure s'arrête à peu près au niveau de l'ancienne paralysie*. Cette chute des poils a atteint son maximum en janvier 1938. Depuis cette période, il y a une amélioration.

Revue en juin 1938, la fourrure est moins belle que celle des autres animaux de la même espèce. Elle est moins foncée et moins brillante. Les mouvements sont moins vifs que ceux des autres animaux, surtout la préhension de la queue. L'arrière-train est resté amaigri.

En janvier 1939, l'état de l'animal se maintient. Il est impossible actuellement de se rendre compte qu'il s'agit d'un animal qui a été atteint. Le fond de l'œil est normal.

Cliniquement, ce cas appartient au même groupe : la paraparésie de l'arrière-train atteignait un maximum au bout de trois semaines, puis elle se mit à régresser, fort lentement. Deux mois et demi après le début, on en trouvait encore quelques signes. Tardivement, l'animal a fait une alopécie couvrant la zone des anciennes parésies. Le nerf optique est demeuré constamment indemne.

On peut considérer aujourd'hui, trois ans et demi après, que la *guérison est complète*. Nous surveillons soigneusement cet animal au point de vue d une nouvelle poussée.

Notre neuvième observation est celle d'un *Cercopithecus nictitans*.

Cercopithecus nictitans IX (162/38), âgé de quatre ans. — Entré au Zoo depuis le mois de mai 1936.

Le début de l'affection remonte au mois de mars 1938. A ce moment le gardien a remarqué que l'*animal était moins sûr de ses membres inférieurs*. Ce singe extraordinairement vif, animé de mouvements brusques, était devenu plus lent, en même temps qu'il élargissait la base de sustentation.

La *queue* à cette époque avait déjà un *aspect anormal* au point de vue *des poils* devenus *cassants* et *secs*. Les matières fécales de l'animal et la poussière de la cage la maculaient, alors que ces singes sont particulièrement propres sur cette partie de leur individu.

Huit à dix jours après un gonflement abdominal avec une ***période de***

diarrhée glaireuse, parfois hémorragique, nous sommes amené à l'examiner. Le 16 mars, l'animal était particulièrement faible sur ses pattes. Elargissement de la base de sustentation. Chutes fréquentes en arrière, puis peu à peu, entre le 15 et le 20 mars, on voit apparaître une démarche digitigrade anormale. Grande nervosité de l'animal.

Les réflexes tendineux étaient conservés, mais il n'a pas été possible de chercher le signe de Babinski. Cette diarrhée a donné un coup de fouet à la maladie.

Entre le 1er et le 20 avril s'est installée progressivement une *paraplégie en extension* avec hyperesthésie de la peau remontant environ jusqu'au nombril. L'attouchement de la peau, de la paroi abdominale et du dos était particulièrement pénible et à plusieurs reprises nous avons observé des phénomènes de miction involontaire à la suite de ces attouchements. Il est impossible de dire si elles étaient déclenchées par l'attouchement de la peau, par des efforts de défense de l'animal pour s'échapper ou peut-être par sa frayeur.

Vers la fin de mai, cette hyperesthésie s'était atténuée considérablement. Le gonflement abdominal reparut avec des périodes de diarrhée non sanglante. Langue sèche, fuligineuse, aspect rougeâtre des gencives mais sans température.

La force des membres supérieurs était conservée. Au début de mai, l'animal se mit à maigrir. Un dernier examen neurologique fut tenté le 6 mai sans succès.

Le moindre attouchement des parties inférieures et même de la queue provoque des réactions très vives de l'animal qui devenait menaçant Devant le danger des morsures, nous avons renoncé à pousser plus loin l'examen. L'appétit restait excellent, la paralysie ne se modifiait pas. Elle était totale, spasmodique en extension, paralysie des réflexes de rétraction de la queue, absence de tout réflexe de préhension de la face plantaire.

Il fut transféré à l'I. B. et sacrifié le 28 mai.

Chez ce singe, nous avons vu débuter la paraplégie spasmodique par une *démarche digitigrade* qui rappelait les « pointes des danseuses » de la maladie de Strumpell ou des leucodystrophies humaines. Les troubles trophiques de la fourrure, observés chez un de nos animaux guéris, précédèrent ici la paralysie flasque de la queue. Chez cet animal, nous avons en outre observé deux périodes de diarrhée glaireuse, hémorragique avec météorisme abdominal, au cours de l'évolution de la paralysie, épisodes qui aggravèrent son état. L'hyperesthésie de la peau déclenchait chez cet animal des réflexes très vifs, des réactions d'agressivité qu'on n'observait pas dans les 2 cas précédents, à telle enseigne que dans la période avancée de l'affection, tout examen neurologique devint impossible.

Voici l'observation histologique de ce cas qui représente une *forme médullaire pure* de la maladie.

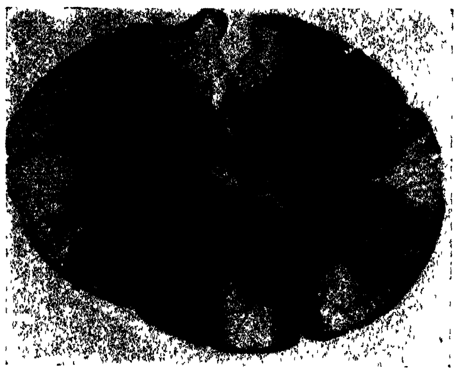


Fig. 16*a*.

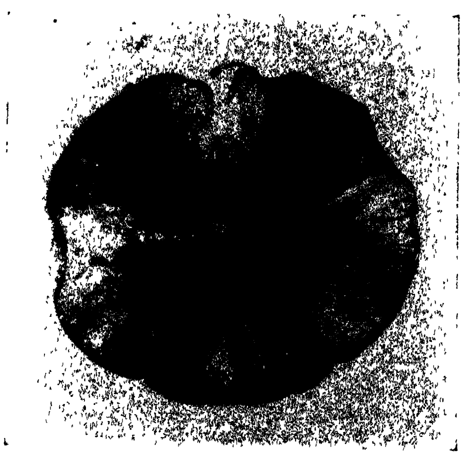


Fig. 16*b*.

Fig. 16*a* et *b*. — *C. nictitans* (162/38). Lésions médullaires aspect pseudo-systematique et spongieux dans la moelle cervico-dorsale.

Myélose funiculaire typique à gros foyers et *extrêmement grave quant à l'extension des foyers* (fig. 16 a et b). Celle-ci est la plus grande au niveau cervical inférieur et thoracique, où les foyers ne détruisent pas seulement une grande partie des cordons postérieurs et latéraux, mais également les parties paramédianes des cordons antérieurs. Tous les foyers, ici, sont assez vastes, on ne rencontre pas de foyers très petits.

Au niveau cervical moyen, les foyers, de dimensions plus petites, se trouvent surtout dans les cordons latéraux et postérieurs, mais il n'y en a plus dans les cordons antérieurs. Au niveau lombaire, on ne trouve qu'une dégénérescence, d'aspect plutôt secondaire (fig. 16 c) des deux côtés dans l'aire de la voie pyramidale latérale, et une aire de gliose cellulaire des parties médianes des cordons de Goll.

Quant à la qualité des foyers, il s'agit d'*états spongieux* tout à fait typiques avec vive désintégration graisseuse à gros corps granuleux, et sans la moindre sclérose. L'état spongieux ne fait défaut qu'au niveau des lésions lombaires. On ne trouve nulle part de lésions inflammatoires.

Le processus épargne, à tous les niveaux, la substance grise.



FIG. 16 *c*. — *C. nictitans* (162/38). Dégénérescence secondaire dans la moelle lombaire (Spielmeyer).

Les faisceaux nerveux de la queue de cheval ne présentent aucune lésion nette, même pas au Scarlach.

Tout le tronc cérébral, toute la substance blanche des hémisphères cérébraux sont sans lésions (Nissl, Spielmeyer, Scarlach).

Les nerfs et le chiasma optique ne présentent pas de signes de dégénérescence.

Dans ce cas, les signes d'une affection intestinale dont nous n'avons pu déterminer la cause, ont accompagné l'évolution de la maladie, qui avait cependant débuté antérieurement. L'état général de l'animal était particulièrement atteint. Il semble que les mauvaises conditions alimentaires jouent un rôle dans le déclenchement de la maladie et c'est à ce même titre que nous rapportons l'observation clinique suivante :

Cercopithecus ouanderou X (M. silenus), mâle de deux ans. — Confié au Zoo par M. B..., marchand d'animaux à Sumatra. *Le navire transportant les animaux a eu un retard de quinze jours pendant lesquels la nourriture fraîche des singes fut insuffisante, une partie des animaux est morte en route.*

Il nous fut signalé quatre jours après son arrivée.

Le 8 octobre 1937 : l'animal présente une *courte crise convulsive* et se cognait aux barreaux et aux parois de sa cage qu'il connaissait cependant. En fait, l'animal était *aveugle*. Pas de clignements à l'approche de la



Fig. 17. — *M. silenus* X. Attitude de torsion du cou typique.

main, pas de retrait de la tête. Celle-ci était tordue sur son axe vertical vers la droite et légèrement rétractée en arrière. Remise en position sagittale, la tête se tournait constamment dans le sens des aiguilles d'une montre (fig. 17). Les yeux étaient anxieux.

Les réflexes étaient normaux. Tous les mouvements étaient conservés.

Le 12 octobre 1937 : la *torsion de la tête* atteignait son maximum.

L'animal faisait des *mouvements de manège* incessants et tombait parfois vers la gauche comme si le côté gauche était parésié. Pas d'altérations des réflexes.

Le fond d'œil était légèrement pâle des deux côtés (examen difficile) [Dr Bauwens].

Le 14 octobre 1937 . tout rentre dans l'ordre. Les réflexes étaient normaux ; de temps à autre encore un mouvement de manège vers la

gauche avec torsion de la tête. Le nystagmus latéral avait disparu. Aux yeux, les papilles restaient pâles.

Le 26 octobre 1937 : l'animal fut remis dans une grande cage avec sa compagne. Il ne présentait plus rien de particulier Les mouvements des yeux, les sauts, les bonds ont aujourd'hui un aspect entièrement normal.

Le diagnostic de la maladie se base, dans ce cas, sur la présence de la cécité avec atrophie papillaire débutante, sur



FIG. 18. — *M. silenus* (299/38). Attitude de torsion du cou, l'animal étant maintenu assis.

l'*attitude de la tête en torticolis*, sur l'existence d'une courte crise convulsive.

La sémiologie de l'affection de ce singe est très proche de celle d'un autre animal de la même variété faisant partie du même envoi.

Cercopithecus ouanderou XI (M. silenus 299/38), femelle de trois ans — On a constaté qu'il était aveugle au même moment où nous avions vu le singe précédent (obs. X). L'état physique de cet animal est cependant meilleur. La tête n'est pas non plus maintenant dans l'axe du cou, mais il peut la redresser et la maintenir droite, quand on lui donne à

renifler un fruit, ce qui n'est pas le cas dans l'observation précédente.

Les pupilles sont en mydriase et les *papilles* sont *décolorées*.

Pas de réflexes pupillaires à la lumière.

Quand il est tranquille, il demeure assis en équilibre, sans écartement anormal des membres antérieurs, mais dès qu'il se redresse la tête tourne à droite et il tombe d'un bloc en arrière. Ce *renversement en arrière* est d'une telle brusquerie que nous n'avons pas encore observé chez d'autres animaux. Quand on maintient l'animal par le dos ou l'arrière-train, il résiste à cette déséquilibration, s'accroche fortement des membres antérieurs et la tête tourne lentement à droite (fig. 18).

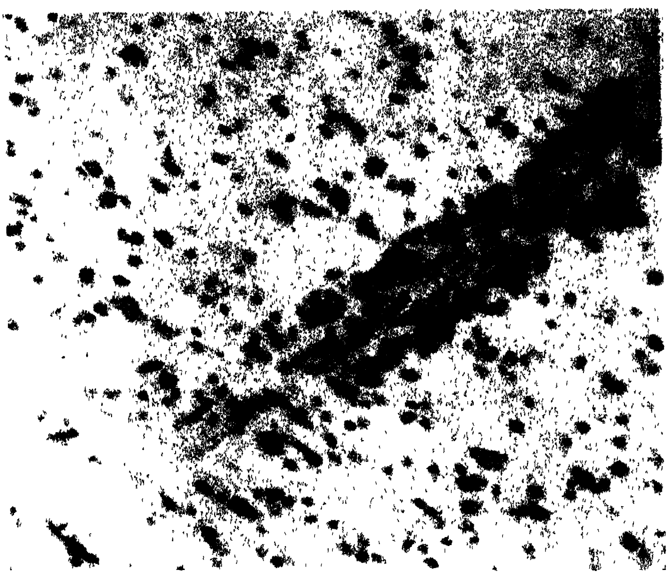


FIG. 19. — *M. silenus* (299/38). Lésions tout à fait au début dans le centre ovale. On voit seulement une réaction périvasculaire lymphoïde et une prolifération diffuse de la macroglie et microglie (Nissl).

Les réflexes tendineux sont conservés.

Les réflexes cutanés plantaires n'ont pu être mis en évidence.

La bouche est saine, les selles sont normales et l'animal continue à manger.

La symptomatologie de cet animal comporte une cécité avec décoloration papillaire, une astasie considérable et une déviation de la tête à droite semblable à celle du singe précédent et du *Maki XII*.

Voici l'observation histopathologique de ce cas :

Les ***hémisphères*** ne montrent sur les coupes myéliniques aucun foyer de démyélinisation. Sur les coupes au Nissl, en examinant soigneusement la région pariétale droite on observe cependant des ***lésions périvasculaires débutantes.*** Celles-ci consistent essentiellement en une prolifération à deux ou trois assises de cellules adventitielles du vaisseau, et en une réaction gliale diffuse comportant à la fois des cellules micro- et macrogliques (fig. 19) Ces lésions ne sont pas encore celles des foyers jeunes comme celui de la figure 8. Comme dans nos autres cas, les noyaux gris centraux, la région hypothalamo-tubérienne, le pédoncule, le cervelet, la protubérance, le bulbe sont intacts.

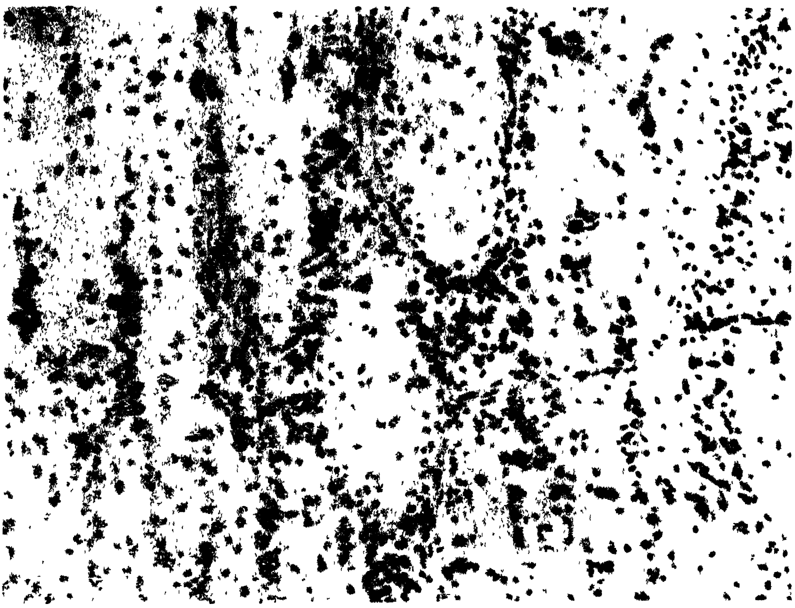


FIG. 20*a*. — *M. silenus* (299/38). Lésions aigues du nerf optique
Au Nissl, infiltration à corps granuleux, légère réaction périvasculaire.

Le *chiasma* présente un foyer important qui se continue dans les bandelettes optiques. C'est le foyer aigu le plus grave que nous ayons observé dans notre série. Périvascularites lymphocytaires et à macrophages denses. Alignement des corps granuleux ou de macroglie engraissée le long des fibres en dégénérescence. Masses confluentes des corps granuleux subissant par endroits un début de nécrose microkystique. Le corps granuleux est au stade soudanophile. La même lésion se continue dans la partie antérieure des bandelettes optiques, surtout dans leur segment médian.

Le *nerf optique*, que nous avons eu rarement l'occasion d'étudier, présente lui aussi des foyers débutants de démyélinisation. A côté d'une réaction péri-capillaire, on voit apparaître d'innombrables corps granu-

leux (fig. 19 *a*), la plupart au stade hématoxylaffine (fig. 19 *b*), quelques-uns au stade soudanophile. Le fond du parenchyme est semé de granulations prenant la laque. Les axones et les gaines montrent des lésions graves. Le processus débute, ici aussi, par des bandes de démyélinisation juxta-vasculaire.

La *moelle*, en outre, montre une dégénérescence spongieuse des cordons postérieurs au niveau de sa partie dorso-lombaire (fig. 20). Le même aspect se retrouve dans la moelle cervicale inférieure et à un moindre degré dans les régions lombaire inférieure et sacrée. Le canal

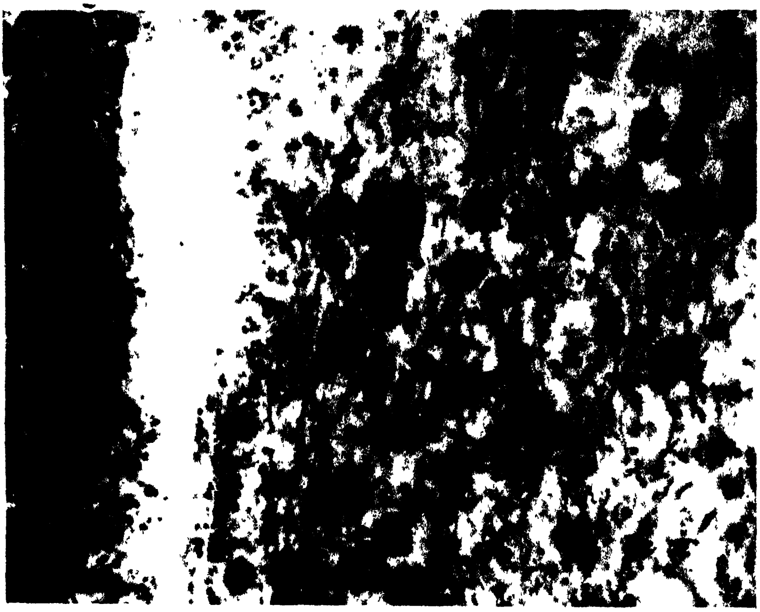


FIG. 20 *b*. — *M. silenus* (299/38). Lésions aiguës du nerf optique. Au Spielmeyer, corps granuleux à granulations hématoxylaffines et axones détruits.

épendymaire présente un certain degré d'hydromélie. La substance grise est intacte.

Les *racines de la queue de cheval* présentent des lésions de démyélinisation parcellaire débutante : fragmentation des gaines avec présence de nombreux myélophages à contenu hématoxylaffine. Pas de corps granuleux ayant pris le Soudan. Les *nerfs périphériques* montrent des lésions extrêmement minimes et qu'il faut rechercher avec soin : nous avons reproduit un de ces aspects. Ils ne sont pas comparables aux lésions des racines.

Cette observation est avant tout une forme optico-médullaire, voisine sinon superposable à l'une des observations de

Levaditi, Hornus et Schoen avec un début d'atteinte du centre ovale, à un stade tout à fait précoce. Les lésions optiques s'étendent ici au nerf optique, au chiasma et aux bandelettes.

2° Groupe des Lémuriens.

Les déterminations neurologiques sont excessivement rares dans le groupe des Lémuriens. Au cours de ces cinq années d'observation, parmi 20 singes de cette espèce, nous n'avons vu qu'une seule fois une affection des centres nerveux. C'est l'observation que voici.

Maki gomböz XII (238/35), mâle de sept ans. — Entré au Zoo en janvier 1929. Cet animal fut isolé le 4 août 1935.

On remarqua, à ce moment, qu'il courait mal ; qu'*il tombait sur le côté gauche*, la patte gauche restait en retard sur le restant du corps. Il fut examiné le 5 août 1935 pour la première fois. Ce qui frappa immédiatement, par comparaison avec les autres *Maki*, c'est que *la tête était tenue obliquement* (fig 21 a), l'oreille gauche étant plus basse que la droite, qu'*elle était animée d'un mouvement de balancement à rythme très rapide, véritable nystagmus de la tête, avec inclinaisons rythmiques du cou vers la gauche*. La tête était également en rotation légère sur son axe vertical (fig. 21 b). Une *exophtalmie très nette de l'œil gauche* était également retenue (fig. 21 c).

Les deux globes oculaires étaient animés de battements rapides, rappelant le nystagmus, mouvements parfois rotatoires, mais l'observation était difficile du fait des battements des paupières. *Les oreilles étaient aussi animées de battements rythmiques.* On observait enfin une incurvation du tronc en arc de cercle autour des membres gauches. Nous n'avions jamais observé chez un Maki un tel complexe de signes neurologiques.

Le 14 août 1935, à un nouvel examen, nous retrouvions l'exophtalmie nette de l'œil gauche avec la cataracte bien connue chez ces animaux. Elle expliquait déjà l'absence de réaction pupillaire à la lumière. On retrouvait l'inclinaison de la tête à gauche, l'oreille gauche étant plus basse que la droite, les globes oculaires présentaient un nystagmus rotatoire de gauche à droite et *différent du nystagmus vertical avec battements oculaires synchrones que présentent les animaux de la même espèce aveugles par cataracte.*

L'inclinaison de la tête à gauche s'accompagnait d'une torsion du cou autour de l'axe longitudinal de gauche à droite, l'axe de l'animal étant considéré d'arrière en avant. Le mouvement oscillatoire et rotatoire de la tête était régulièrement rythmique, à la vitesse de 80-100 battements par minute, interrompu par moments par un véritable *frissonnement* de la tête plus rapide et moins ample. L'œil droit était le plus souvent fermé. *Les paupières présentaient par moments des mouvements d'occlusion, synchrones du mouvement de la tête*, mais il était difficile d'en apprécier la vitesse.



Fig. 21 *a*.



Fig. 21 *b*



Fig. 21 *c*.

Fig. 21. — Trois instantanés de *Maki gombòz* (238/35) montrant les particularités d'attitude de la tête. *a*, inclinaison latérale autour de l'axe bimastoïdien; *b*, torsion sur l'axe du corps; *c*, exophtalmie gauche.

L'animal avait maigri.

Le 29 août 1935, la patte droite était aussi tenue immobile, montrait une certaine parésie quand l'animal s'accrochait aux barreaux de la cage. De temps à autre il tombait de son grillage.

Assis par terre, il écartait démesurément les pattes d'avant (fig. 22), le membre inférieur droit était peu utilisé, le mouvement était désordonné : ce manque d'harmonie ne s'observait pas chez les animaux aveugles par cataracte.

Pas de rigidité apparente de la nuque.

Les réflexes tendineux étaient conservés. La force de la queue était normale.

Le début est ici aussi parétique, unilatéral. Il s'accompagne rapidement d'une torsion de la tête à gauche, avec un mou-



FIG. 22. — *Maki gombòs* (238/35). Les deux animaux sont aveugles (cataractes). comparer l'attitude de la tête de l'animal à gauche atteint d'une affection nerveuse, à celui de droite indemne.

vement oscillatoire rythmique rappelant le torticolis tremblant. Cette torsion amorce une rotation axiale que nous avons décrite dans tous ses détails et un nystagmus rotatoire, tous deux de gauche à droite, c'est-à-dire dans un sens antihoraire, si l'observateur se place dans l'axe du corps de l'animal d'arrière en avant. Ce mouvement oscillatoire de la tête et des globes oculaires peut se communiquer par moments aux paupières. Après trois semaines de maladie, l'affection apparaît également au niveau des membres gauches. C'est peu après que l'animal fut sacrifié.

Cette attitude de la tête, l'incurvation de la nuque sur l'axe du corps, l'exophtalmie gauche par parésie faciale sont bien

visibles sur les photographies. L'une de celles-ci montre notre *Maki XII* à côté d'un *Maki* aveugle par cataracte, mais sans affection neurologique : la différence d'attitude et l'élargissement de la base de sustentation des membres antérieurs sont frappants Le mouvement trémulant bien rapide, observé chez ce lémurien, était absolument superposable aux frissonnements prolongés observés chez le *Macacus rhesus IV* de notre groupe et chez *Cercopithecus ouanderou X* où il s'accompagnait en outre d'une attitude de torticolis que nous avons reproduite.

L'affection évolue ici comme une double hémiplégie. Nous n'avons pas de renseignements sur le fond de l'œil à cause des cataractes.

Voici l'observation histologique de ce cas :

Au niveau de l'encéphale, la coupe myélinique la plus antérieure passe par la région frontale : immédiatement en dessous de l'ébauche du *S. precentralis superior*, on voit les premières plaques de démyélinisation Elles se continuent en dessous du *G. frontalis medialis* où elles atteignent leur plus grand développement. On n'en trouve pas dans d'autres régions La coupe suivante passe par la partie antérieure des noyaux gris centraux et le genou du corps calleux. Le corps calleux et l'axe blanc sont intacts. Immédiatement en dehors du corps calleux, en dessous du *G. cinguli*, la démyélinisation commence On voit qu'elle porte aussi bien sur les fibres calleuses que sur les fibres propres au centre ovale. Elle est très nette en dessous du *G frontalis superior* qui borde l'hémisphère en dedans, encore plus nette dans toute la substance blanche du *G frontalis inferior* et du *G. opercularis*. Elle n'existe plus au niveau de l'axe blanc du *G. temporalis anterior* ni au niveau de la pointe du *G. temporo-occipitalis* dont on aperçoit l'extrême antérieur. Le pallidum, la capsule interne, le septum pellucidum, la commissure blanche antérieure ont leur structure normale.

La coupe suivante passe plus en arrière par la région du tuber. On voit ici quelques petits foyers symétriques mais beaucoup moins importants. Ils occupent la substance blanche du *G. frontalis medialis* et *lateralis*. On les trouve aussi au niveau de la mince bande blanche qui sépare le *G opercularis* de la partie supéro-externe du putamen. Ces lésions sont ici aussi symétriques. La capsule interne et les noyaux gris centraux sont intacts.

La première coupe cytologique passe par la région préfrontale en avant du genou du corps calleux. Nous décrirons successivement l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche, quoique les lésions soient symétriques (fig. 23).

L'architecture des *G cinguli, frontalis medialis* et *lateralis opercularis* est conservée. L'avant-mur, le putamen, le noyau caudé ne présentent pas de grosses altérations, de même que la partie visible du *G. rectus*. Les lésions de la substance blanche couvrent en étendue celles décrites

sur les coupes myéliniques. On voit un vaisseau fortement infiltré dans la substance blanche, un autre dans la partie ventrale du putamen. Il y a une légère réaction méningée au-dessus des deux *G. frontalis*, c'est-à-dire au-dessus des lésions de la substance blanche. Dans l'hémisphère gauche, on observe les mêmes localisations sauf la lésion du putamen.

La coupe suivante passe un peu plus en arrière et ne montre rien d'anormal. La coupe cytologique suivante passe par le plein développement du *G. incinatus* et le pied du pédoncule. Nous décrirons successivement aussi l'hémisphère droit et gauche. Les structures des *G. parietalis superior, parietalis inferior* sont normales. La méninge qui les

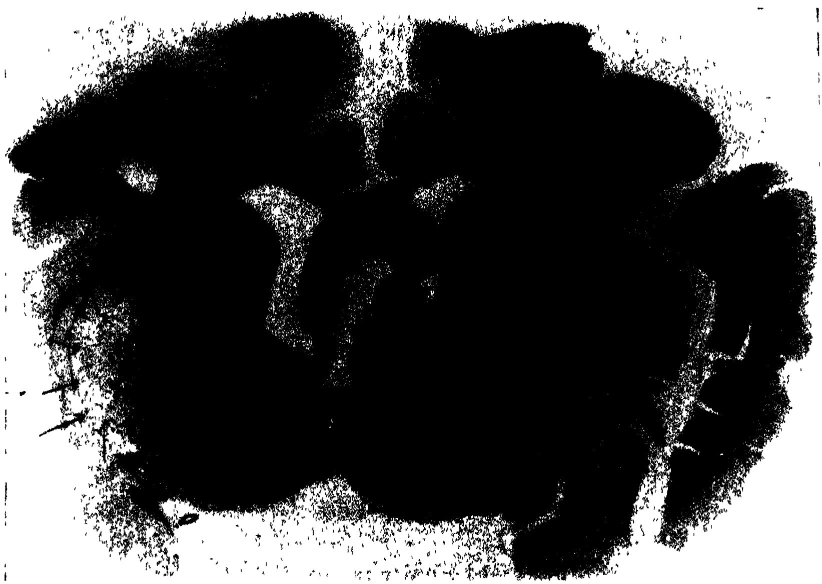


FIG. 23. — *Maki gombös* (238/35). Grande coupe des deux hémisphères montrant les lésions démyélinisantes du centre ovale des deux côtés et le foyer du putamen (Spielmeyer).

recouvre est par places plus infiltrée que normalement. Le *G. paracentralis superior* présente de grosses lésions de substance blanche. Ces lésions se continuent quoique moins importantes dans la substance blanche du *G. temporalis anterior* qu'on retrouve ici. Elles s'atténuent peu à peu au niveau de la mince bande blanche qui sous-tend le *G. temporalis anterior* et qui se continue elle-même dans le *G. uncinatus*. L'écorce du *G. temporalis anterior* paraît conservée. L'hippocampe, le corps calleux, les corps genouillés, le pulvinar, le tuber sont intacts. Dans l'hémisphère gauche, les mêmes localisations se retrouvent. L'infiltration méningée est identique dans l'hémisphère opposé.

Une coupe passant par les tubercules quadrijumeaux, les noyaux oculo-moteurs et le locus niger ne montre pas de lésions.

Une coupe passant par le bulbe, en avant des olives, montre également l'intégrité de cette région. Les noyaux du toit, les noyaux dentelés sont intacts.

Les lésions dans les centres ovales sont, quoique beaucoup plus graves, en tous points comparables à celles observées dans le groupe des Cercopithèques. La moelle ne présente qu'une prolifération macrogliale très fraîche au niveau des voies pyramidales latérales, sans signes de désintégration myélinique ou graisseuse.

Cette dégénérescence pyramidale est probablement secondaire à l'atteinte des centres ovales comme H. J. Scherer l'avait déjà montré dans sa série de 1932. *Ce qui est tout à fait particulier dans ce cas et jusqu'à présent unique, c'est la présence dans le putamen d'un foyer de dégénérescence débutante avec prolifération macrogliale, une légère prolifération des vaisseaux et apparition de quelques corps granuleux chargés de graisses.*

III. — Commentaires.

I. — *Au point de vue histopathologique*, en dehors du *Maki gomböz XII* nos cas n'apportent aucun fait nouveau et correspondent exactement aux descriptions de Schob (1930) et H. J. Scherer (1932-1937).

Nos protocoles d'examens anatomiques tirent leur intérêt du fait qu'ils concernent des animaux dont l'analyse clinique a été conduite aussi exactement que possible et qui ont été suivis pendant toute l'évolution de leur affection. Certains cas se sont prêtés admirablement à la technique histopathologique. Nous avons cru qu'il était intéressant d'en reproduire les images caractéristiques.

II. — *Au point de vue clinique*, le tableau ci-contre permettra de se rendre compte, d'un coup d'œil, de l'ensemble de nos observations (fig. 19).

Cependant, les différentes périodes de la maladie méritent d'être connues.

a) *Le début de l'affection est insidieux et progressif.* Les orangs-outangs de Schob ont d'abord présenté une parésie péro-

nière, puis une faiblesse de préhension de la main. Chez les animaux de H. J. Scherer, on avait noté des phénomènes d'apparence dysentérique. Ces incidents dysentériques ont été relevés au cours de la maladie chez notre *Cercopithecus ascagnus* (162/38), mais l'affection neurologique évoluait déjà à cette époque. Ils faisaient défaut dans tous nos autres cas. Une alimentation déficiente pouvait être incriminée dans notre observation X et XI.

L'animal de Perdrau avait subi des mauvais traitements de ses compagnons de cage et avait maigri, sa marche était devenue peu à peu bizarre. Chez ceux de Schroeder, Levaditi, Hornus et M^lle^ Schoen, la cécité avait seule attiré l'attention. Cette cécité a attiré l'attention dans trois de nos cas (III, IV, X), mais elle fut méconnue dans deux autres (II, VI). Nous avons indiqué plus haut qu'après une période où la cécité est cliniquement apparente, l'animal se comporte comme si elle avait disparu (III, IV) ou comme s'il s'adaptait à ses troubles visuels (VII). Il semble que dans certains cas la maladie puisse évoluer d'une façon extrêmement discrète, n'être représentée que par un accès convulsif suivi d'une période d'adynamie. Le début peut être convulsif (X). Les *crises de frissonnement* observées dans notre observation IV, et celles du Maki XII représentent vraisemblablement des *équivalents épileptiques*. On comprend qu'elles passent inaperçues d'autant plus que la crise épileptique est un mode de réaction observé avec une grande fréquence chez les singes des espèces les plus différentes. On n'a pas décrit, avant nous, dans cette affection de manifestations épileptiques, seul Perdrau a vu survenir chez l'animal en colère des spasmes cloniques des quatre extrémités.

b) *La période d'état est dominée par l'apparition des paralysies*. La faiblesse d'un membre supérieur ou inférieur ou des deux, se change en parésie, en paraplégie qui persiste pendant un temps variable, puis en une quadriplégie (Schob, Schroeder, Scherer, Perdrau). Le début distal hémiplégique se retrouve dans un des cas de Schob, où la paralysie a atteint ensuite le côté opposé et d'une manière identique. L'extrémité céphalique n'a pas été épargnée dans ce cas, contrairement aux nôtres.

Le cas I, de F. Schob, débuta par une certaine lenteur des mouvements puis une paralysie péronière bilatérale. Il restait longtemps couché, ne se relevait plus que contraint, puis finalement restait couché. Il eut aussi une paralysie des membres supérieurs et mourut environ un an après le début clinique de la maladie. Le cas II, de Schob, débuta également par une diminution de la force de préhension du pied, puis de la main gauche. Après une période d'amélioration, il s'aggrave de nouveau. Au bout de deux mois, on nota chez lui aussi une parésie des deux jambes, plus légère des bras, intéressant surtout les segments distaux. La station debout était impossible, la force de préhension des mains également minime. Il n'y avait ni ataxie, ni tremblement intentionnel. La paralysie était surtout nette au niveau des pieds, un peu moins nette au niveau des jambes et des cuisses, les membres supérieurs atteints dans leur ensemble. La musculature de la nuque et du tronc ne fut pas épargnée. L'animal restait ramassé sur lui-même comme une masse, et vers la fin, présenta de petits troubles de la déglutition. La nourriture retombait parfois de la bouche et il eut de violentes quintes de toux. Pas de troubles de la sensibilité algique. Pas d'indications d'une anémie. Les deux cas de Schob montraient un tableau clinique typique et superposable : début aux membres inférieurs, au niveau de l'extrémité, atteinte tardive du tronc, du cou et de la déglutition. Sensibilité intacte. Evolution lente de huit mois ou un an.

Cette paraplégie s'accompagne le plus souvent de la disparition de plusieurs réflexes achilléens et rotuliens tricipitaux tandis que d'autres sont vifs (Perdrau), mais tous peuvent être conservés (Schroeder). Dans des formes peu graves (VIII) ou évoluant vers la guérison, les réflexes tendineux sont conservés. On les retrouve parfois dans des cas à évolution grave mais avec une moelle intacte (XII). On peut aussi les voir persister assez longtemps pour disparaître ensuite rapidement et définitivement comme dans notre observation IX. Nous les avons trouvés abolis dans deux de nos cas (V, VI). Leur abolition ou leur conservation n'ont pas une grande signification, comme nous l'avons indiqué, à cause de la difficulté de leur recherche, résultant des efforts de défense ou de l'absence de relâchement des muscles chez ces animaux. Malgré cela, nous nous sommes demandé si leur conservation tardive ou leur abolition précoce ne permettraient pas de distinguer les formes de diplégie d'origine cérébrale de celles d'origine médullaire. L'animal peut en effet se trouver complètement paralysé à la suite d'une double hémiplégie. C'est le cas du Maki XII où les réflexes tendineux sont conservés ainsi que les mouvements de la queue jusqu'à la fin. Il n'en serait pas de même dans les paraplégies médul-

laires où les réflexes de préhension et de retrait de la queue sont précocement abolis, ainsi que les réflexes tendineux (obs. IX). Nous avons décrit plus haut des observations cérébrales (V) avec abolition précoce des réflexes et sans lésions médullaires qui incitent à la réserve. La gravité des troubles sphinctériens trophiques et sensitifs indique sans doute l'importance de l'atteinte spinale (IX). Dans cette localisation médullaire, l'extrémité céphalique reste indemne : il n'y a pas de pseudo-exophtalmie par paralysie faciale comme dans la forme hémiplégique (XII) et, dans plusieurs cas, les membres supérieurs sont restés indemnes.

On voit décrire parfois une titubation (Levaditi, Hornus et Schoen [III]), une démarche dysmétrique avec entrecroisement des jambes (Perdrau) et de l'ataxie (Schroeder) ; nous-même avons observé une certaine maladresse, mais nous n'oserions pas, à coup sûr, en faire, chez ces animaux aveugles et parésiés, un signe d'atteinte cérébelleuse d'autant plus que les lésions cérébelleuses font défaut. Les *mouvements de manège et de torsion autour de l'axe* observés chez certains animaux peuvent évoquer évidemment l'idée de troubles labyrinthiques et cérébelleux ; de même la facilité avec laquelle certains de ces animaux, normalement si habiles, culbutent par-dessus la tête (V). Le nystagmus avec battement palpébral et tremblement céphalique rythmique du Maki XII concorderait avec ces signes. Nous croyons cependant qu'*il faut rapporter ces troubles du tonus et de l'équilibration aux lésions de la substance blanche pariétale, localisation classique et la plus fréquente*. Cette anomalie d'attitude du Maki XII ne peut, en effet, dans ce cas, n'être attribuée qu'aux lésions du centre ovale, ce sont les seules qu'on relève à l'autopsie. Peut-être le torticolis doit-il son caractère trémulant à l'atteinte concomitante du putamen mais, pour l'affirmer, il ne suffit évidemment pas d'une seule observation. La déviation de la tête très discrète et discontinue de notre observation XI est-elle à rapprocher des lésions débutantes d'un des centres ovales ? Cette hypothèse peut être envisagée mais l'existence d'une grave lésion des cordons postérieurs indique que l'appareil de coordination est touché, et plus intensément, à un autre niveau de ses voies afférentes. Ces *anomalies d'attitude de la tête* risquent de passer

inaperçues pour un observateur non averti, d'autant plus qu'elles *ne sont pas durables*, comme le souligne notre observation X.

c) La *terminaison* de la maladie est quelquefois fatale spontanément (III). Les animaux présentant la forme médullaire ont été sacrifiés. Les formes cérébrales peuvent mourir à l'improviste, probablement au cours d'un état de mal épileptique ou par dénutrition. Les formes optiques survivent le plus souvent. Nous avons décrit 2 cas évoluant vers la guérison (VIII, X) et suivis depuis plus de deux ans. C'est là une éventualité très fréquente et le pronostic de l'affection reste très favorable.

d) La question des *récidives* ou des *poussées* a été étudiée par H. J. Scherer à propos de son observation personnelle où l'affection avait passé cliniquement inaperçue. Sur 3 cas suivis pendant longtemps, nous n'avons pas surpris de seconde poussée (IV, VIII, X), mais étant donné la discrétion clinique de cette maladie, ce fait ne doit pas faire réserver l'existence d'une évolution par phases. Il existe d'ailleurs une observation de cet ordre dans la littérature : celle de Steiner. Un *Macacus rhesus* fut inoculé, en mars 1917, par 1 cent. cube de liquide provenant d'une sclérose multiple, il fait en février 1918 une parésie avec rémission, en juin 1918, une paraplégie flasque des membres inférieurs puis supérieurs et fut sacrifié quatre semaines après le début de cette seconde poussée.

e) En présence de cette évolution phasique, il devient difficile d'apprécier la *durée d'évolution de la maladie*, d'autant plus que les animaux sont souvent sacrifiés avant leur mort naturelle (Steiner, Scherer). On a noté dans les autres cas : un mois (Levaditi, III), trois mois (Schob, I), cinq mois (Steiner), huit mois (Schob, II), neuf mois et demi (Levaditi) Les poussées que nous avons observées durent de trois semaines à trois mois : les formes médullaires ont la durée la plus longue.

III. — *Après avoir esquissé cette courbe générale de la maladie, on doit se demander s'il est possible d'en établir des types cliniques ayant une valeur diagnostique. Nous croyons que ces types existent et qu'il y en a trois.*

1° *La forme optique caractérisée par l'atrophie papillaire bilatérale* de Morax répond à la « cécité épidémique » de

Levaditi. Elle est représentée par les cas de Schroeder ; Levaditi, Lépine et Schoen ; Levaditi, Hornus et Schoen et à l'état pur par nos cas II et III (fig. 6).

2° *Les formes cérébrales caractérisées par des manifestations convulsives, une dystonie simple* (fig. 21) *ou tremblante* (fig. 18), *des hémiparésies* (fig. 7), *hémiplégies ou diplégies cérébrales*, formes jusqu'à présent non décrites. Ces cas répondent aux lésions de la « leuco-encéphalose périvasculaire confluente » de Scherer ou de la « sclérose disséminée confluente » de Schob, de l' « encéphalite périaxile diffuse » de Perdrau. Nos observations I, V et XII en représentent des exemples purs.

3° *La forme médullaire caractérisée par une paraplégie en extension* (fig. 10 *a*), *puis en flexion* (fig. 11 *b*) mais *susceptible de guérir* dans de rares cas. Ces cas répondent aux lésions de la « myélose funiculaire » de H. J. Scherer et Hamarton. Notre observation IX en offre un exemple typique. Ces divers types se combinent régulièrement entre eux: dans cette seule série de douze observations nous trouvons déjà trois combinaisons optico-médullaires (XI), une combinaison optico-cérébro-médullaire vérifiée (VII). *Ces trois formes ne sont que des modalités cliniques d'un seul et même processus histopathologique dont H. J. Scherer a affirmé, à très bon droit, l'unité.* Elles dépendent de l'endroit du névraxe où la maladie débute ou évolue. L'unicité des trois formes est déjà impliquée dans le titre même que Schob donne à son travail. Nous préférons une autre appellation, que H. J. Scherer a proposée, parce que cette appellation précise le siège, la genèse par confluence, la localisation périvasculaire, le caractère plus dégénératif qu'inflammatoire de cette curieuse affection, sa ressemblance à la myélose funiculaire humaine et ne préjuge en rien de son étiologie.

IV. — *Elle semble dans certains cas toucher des groupes* entiers d'animaux, mais ce n'est pas une règle. Les cas de Schob et de Gärtner proviennent d'un même lot d'orangs-outangs venus ensemble de Sumatra. Ceux de Levaditi proviennent d'une série de 12 cas observés sur un lot de 120 singes originaires de l'Himalaya et observés à l'Institut Sérothérapique de Milan. Ceux de Scherer, d'une série de 10 animaux acquis par Eckstein et dont six auraient guéri.

L'affection n'a aucune prédilection d'espèce. Elle a été décrite

chez les *Simia satyrus* (orangs-outangs) [Schob, I et II] ; *Papio hamadryas* (Scherer, 1932, Gärtner, I et II) ; *Papio cynocephalus* (Davison) ; *Macacus rhesus* (Steiner, Perdrau, Levaditi, Hornus et Schoen, Scherer, 1937) ; *Cynopithecus maurus* (Gärtner) ; *Cercopithecus fuliginosus* (Schroeder).

Dans la série que nous apportons aujourd'hui, nous l'avons observée en outre chez *Cercopithecus ascagnus* (VI, VII) ; *Cercopithecus petaurista* (VIII) ; *Cercopithecus nictitans* (IX) ; *Cercopithecus ouanderou* (X et XI) et enfin chez un Lémurien, *Maki catta gomböz* (XII).

En raison du caractère pseudo-épidémique de certaines séries, on a pensé à une étiologie infectieuse. C'est dans ce sens que s'orientent les recherches de Levaditi et de ses collaborateurs. Malgré leurs recherches et celles de W. Gärtner, cette étiologie infectieuse nous paraît peu probable. *L'idée d'un trouble de nutrition ou d'une avitaminose est plus séduisante, tout en n'étant pas démontrée. Une anémie peut être écartée. Les mauvaises conditions alimentaires paraissent favoriser l'apparition de l'affection.*

*
* *

Les lésions que nous venons de décrire ont été comparées à trois maladies nerveuses de l'homme.

A cause de l'association de la dégénérescence des cordons postérieurs et de l'atteinte des nerfs optiques, Rothmann et Schob l'ont comparée au tabes, mais ni l'un ni l'autre ne poursuivirent très loin cette analogie à cause de la prédominance des lésions cordonales au niveau lombaire (Rothmann) et de la coexistence de plages de démyélinisation dans les centres ovales (Schob).

La présence de ces plages dans le centre ovale, le fait que la plupart respectent les fibres en U, fit surgir dans la pensée de Levaditi et de ses collaborateurs, de Perdrau la notion de son analogie avec la sclérose multiple et diffuse. Le fait que nous sommes en présence de lésions avant tout périvasculaires et confluentes, leurs limites imprécises, l'intégrité des régions périventriculaires des formations grises, de la substance blanche ponto-bulbaire, la topographie régulière des lésions spinales doivent faire écarter cette comparaison.

Une troisième maladie humaine a, par contre, avec l'affection des singes des ressemblances histopathologiques frappantes.

H. J. Scherer a basé son rapprochement des lésions médullaires du singe avec celles de la myélose funiculaire humaine à la fois sur la *qualité* des lésions (désintégration rapide allant jusqu'à la cavitation, tendance à la confluence) et leur *localisation* à la substance blanche, leur *prédilection* « pseudo-systématique » pour les cordons postérieurs et latéraux surtout de la moelle dorsale, la *limitation* des dégénérescences secondaires à la moelle cervicale et lombo-sacrée.

Or, dans la myélose funiculaire humaine on a décrit dans quelques rares observations de foyers cérébraux atteignant aussi la substance blanche des centres ovales, ayant la même tendance confluente, épargnant certains systèmes (les fibres en U par exemple, lobes temporaux, corps calleux, circonvolution supracalleuse). Dans les foyers cérébraux du singe c'est à cause de la disposition des fibres du centre ovale qu'on n'observe pas d'aspects spongieux. Comme chez l'homme (Bodechtel) [7], la désintégration graisseuse y est tardive, la neuroglie étant représentée surtout par la macroglie protoplasmique engraissée.

Quant aux lésions optiques de la myélose funiculaire, elles sont très mal connues chez l'homme. Seul Bielschowsky en décrit au niveau du chiasma et de son voisinage, la bandelette ne montrant que des altérations secondaires ou nulles dans des myélites qu'aujourd'hui nous considérions comme faisant partie de la myélose funiculaire.

Bien que H. J. Scherer n'ait pas pu étudier le segment antérieur des voies optiques mais seulement les bandelettes, les données de son cas Manga rendaient déjà cette analogie très plausible. *Notre observation XI permet une étude des lésions du nerf optique lui-même et confirme la description de F. Schob* : les réactions périvasculaires qui manquent dans le cas de Schob y sont présentes, les produits de désintégration ne sont pas encore dispersés comme dans son cas, mais localisés au voisinage des foyers. Les lésions du nerf optique sont plus récentes que celles du chiasma.

Sans doute, les lésions cérébrales n'atteignent-elles jamais, chez l'homme, cette extension ; les lésions optiques et celles des racines postérieures y sont-elles exceptionnelles : cette

différence, intéressante au point de vue de la neuropathologie comparée, n'enlève rien à la valeur de la comparaison proposée (Scherer). Un chaînon nouveau de comparaison se retrouve dans les faits rapportés récemment par Sjövall [**8**], d'une forme cérébrale de l'anémie pernicieuse à foyers démyélinisants multiples et importante, sans myélose funiculaire. On connaît aujourd'hui en clinique humaine, à côté de la forme médullaire (dégénérescence combinée subaiguë), une forme optique et médullaire combinée dont nous avons après d'autres [**9**] rapporté des cas et une forme cérébrale, se présentant sous forme d'une hémiparésie progressive avec troubles de la conscience (Westphal-Sjövall) : trois aspects que nous avons vus, parmi d'autres, chez le singe.

Le fait que, chez un de nos animaux, nous ayons constaté une lésion exceptionnelle de la substance grise sous forme d'un foyer putaminal ne change rien à la validité de cette comparaison. Ce fait reste unique. Ensuite, si la substance grise est de fait épargnée dans la myélose funiculaire, des exceptions ont été signalées : la colonne de Clarke a été trouvée lésée par une série d'auteurs (voir Bodechtel), des glioses ont été signalées sans lésions cellulaires (Wohlwill [**10**], Bodechtel). Nous-même avons, dans un cas observé avec A. Delhaye [**11**], signalé des glioses analogues dans le noyau dentelé, le noyau interne du thalamus, des lésions cellulaires indéniables, dans les formations grises ainsi que dans les formations pigmentaires du diencéphale. Une dégénérescence des deux pallidums avec démyélinisation a été signalée par Paviot et Dechaume [**12**], de même nature, disent ces auteurs, que les lésions médullaires dans un cas de syndrome neuro-anémique paraplégique.

Nous ne voudrions pas cependant qu'on nous prête, du fait de notre insistance sur cette analogie avec les myéloses funiculaires humaines, une arrière-pensée étiologique. Tout au plus inclinerions-nous à penser que *la cause de cette maladie simienne doit plutôt être recherchée dans un trouble toxique d'origine carentielle ou alimentaire que dans l'intervention d'un agent infectieux.*

Si les considérations de pathologie comparée ne permettent, au point de vue de la place de cette maladie dans le cadre nosographique actuel, aucune conclusion plus précise, du moins

comportent-elles une réserve sur certaines classifications des maladies de la substance blanche.

C. Levaditi met à la base de sa classification de certaines leuco-névraxites une distinction entre les fonctions de la microglie d'origine mésodermique et de l'oligo-dendroglie d'origine ectodermique, celle-ci ayant une action trophique sur l'anabolisme lipidien de la gaine myélinique. Il admet que, parmi les ultravirus des leuco-névraxites, les uns sont microgliophiles et oligodendrophiles, les autres sont en outre neuronophiles.

Les démyélinisations qui caractérisent les leuco-névraxites procéderaient de deux mécanismes différents : l'un inflammatoire et lipolytique, l'autre lipotrophique. Dans le premier type, la myéline fragmentée puis lysée serait reprise par la microglie dont la prolifération périvasculaire passerait à l'avant-plan et constituerait la première étape d'une inflammation intéressant également le système vasculo-conjonctif. Dans le second type, la démyélinisation résulterait d'un trouble du métabolisme des lipides, ayant pour origine une viciation de l'oligo-dendroglie. Parmi les « leuco-névraxites lipotrophiques » Levaditi range la « maladie de Schilder-Foix du singe », étudiée par Levaditi, Lépine et Schoen.

Cette tentative de classification, que nous n'avons cru devoir citer ici que parce qu'elle a été reprise par des cliniciens, repose en fait sur une induction purement spéculative. Située en dehors des faits, elle ne peut en rien contribuer à l'interprétation de ceux-ci. Dans l'ignorance où nous nous trouvons, il nous a paru plus prudent de nous en tenir aux seules données que l'analyse histopathologique nous livre. Nous les avons confrontées avec les faits cliniques, tout en insistant sur la difficulté que présente l'établissement d'un status précis chez l'animal.

Avant de terminer ce travail, nous tenons à remercier MM. le Directeur L'Hoest et le Médecin-vétérinaire Collet du Jardin zoologique d'Anvers, qui, pendant cinq années, nous ont accordé généreusement toutes facilités pour ces recherches et le D^r H. J. Scherer, notre chef de laboratoire d'anatomie pathologique, dont la compétence spéciale dans ce domaine nous a été très précieuse.

N. B. — Lors de la correction de cette épreuve, nous avons eu connaissance d'un nouveau cas publié par MM. Weston Hurst et Mc Lennan (*VI[e] Rapport annuel de la Société Sud-Australienne de Zoologie et d'Acclimatation*). Il s'agit de la même affection observée sous une forme cérébro-médullaire chez un *M. rhesus* vivant dans des conditions d'hygiène se rapprochant autant que possible des conditions d'habitat naturel.

BIBLIOGRAPHIE

[1] SCHOB. Disseminierte, konfluierende Sklerose des Hemisphärenmarklagers des Affen kombiniert mit systematischer Erkrankung des Sehnerven sowie der Hinterwurzeln und Hinterstränge. *Z. Neurol.*, **135**, 1931, p. 95.

[2] LEVADITI, LÉPINE et SCHOEN. Maladie de Schilder-Foix (sclérose cérébrale centro-lobaire) spontanée chez le singe. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 986.

[3] SCHERER (H. J.). Funikuläre Spinalerkrankung mit schwerer Beteiligung des Grosshirnmarkes und Opticusveränderungen bei funf Pavianen. *Z. Neurol.*, **141**, 1932, p. 213.

[4] LEVADITI, HORNUS et SCHOEN. Cécité spontanée épidémique du singe dans ses rapports avec la leuconévraxite amaurotique humaine. Mécanisme pathogénique. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, **110**, 1933, p. 37.

[5] LEVADITI, HORNUS et SCHOEN. Cécité spontanée chez les singes de l'espèce de *M. rhesus. C. R. Soc Biol.*, **113**, 1933, p. 288.

[6] SCHERER (H. J.). Sur une forme à évolution phasique de la leucoencéphalose périvasculaire confluente chez le *Macacus rhesus. Rev. Neurol.*, **68**, 1937, p. 807.

[7] BODECHTEL. Die Pathologie des Nervensystems bei Blutkrankheiten. *Z. Neurol.*, **158**, 1937, p. 69.

[8] SJÖVALL. Die herdformigen Veränderungen im Gehirn bei der perniziösen Anemie. *C. R. III[e] Confer. Intern. Path. Georgr.*, Helsingsfors, 1937, p. 287

[9] COHEN. Optic atrophy as the presenting sign in pernicious Anaemia. *Assoc. British Neurologists*, Edinburg, 1936, p. 3.

[10] WOHLWILL. Doençàs do sangue e sistema nervoso. *Lisbon Medica*, n° 4, 1925.

[11] DELHAYE (A.) et VAN BOGAERT (L.). Les myélites funiculaires en dehors de l'anémie pernicieuse. *Ann. de Méd.*, **34**, 1933, p. 60.

[12] PAVIOT (J.) et DECHAUME (J.). Syndrome neuro-anémique avec lésions diencéphaliques et tuberculose pulmonaire scléro-caséeuse enkystée. *J. de Méd. de Lyon*, 20 janvier 1933.

INFLUENCE DES ANTICOAGULANTS SUR LE DOSAGE DES ÉLÉMENTS DU SANG

par V. CHORINE.

(*Institut Pasteur. Service de M. le Professeur Marchoux.*)

DEUXIÈME PARTIE (1)

Influence de la perméabilité globulaire sur le taux des protéides du sérum.

Dans la première partie de ce travail, nous avons indiqué les résultats du dosage, sur un même animal, des protéides du sérum et du plasma sanguin ; ce dernier a été obtenu par centrifugation rapide, dans des tubes paraffinés, du sang non additionné d'anticoagulants. Dans ces conditions, le plasma se montre constamment plus riche en protéides que le sérum correspondant : le taux des protéides sériques étant de 4 à 9 grammes par litre ou de 7 à 16 p. 100 plus faible que celui du plasma. Il est difficile de concevoir qu'une telle diminution de protéides soit uniquement due à l'élimination de la fibrine qui représente habituellement de 0,2 à 0,4 p. 100 des protéides totaux du plasma [**133, 145**]. Nous avons pensé qu'il existe peut-être un échange d'eau entre les globules et le milieu environnant au cours de la coagulation.

a) Moment de la séparation du sérum du caillot sanguin. — Pour étudier cette question, nous nous sommes assuré d'abord que la richesse du sérum en protéides reste constante et ne dépend pas du temps de contact du sérum avec le caillot. Les indications bibliographiques recueillies sur ce sujet sont contradictoires. Kylin, soit seul, soit avec Kristenson [**106-108**], a trouvé que la composition du sérum varie sensiblement suivant le temps de contact avec le caillot.

(1) Voir ces *Annales*, n° 3, septembre 1939, p 213.

Ainsi il trouve que dans le sérum, le taux des protéides totaux subit des variations allant jusqu'à 30 p. 100. La fraction albuminique diminue et la fraction globulinique augmente pendant les premières heures après la coagulation du sang. Ce travail a été sévèrement critiqué par Bing [15], qui ne trouve aucune modification du taux des protéides totaux du sérum, prélevé du caillot à des moments différents après la coagulation du sang. Il ne confirme pas non plus les variations du rapport albumine/globuline, observées par Kylin.

Toutes nos expériences ont donné des résultats identiques à ceux de Bing et, par suite, contraires à ceux de Kylin. Voici, à titre d'exemple, un de nos dosages.

Expérience n° 45. — On saigne un lapin à la carotide. On prélève le sang dans cinq tubes à essai bien propres, lavés au mélange sulfochromique, à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et séchés à l'étuve. Les tubes, aux trois-quarts remplis de sang, sont bouchés au caoutchouc et conservés à la température du laboratoire. Chaque tube nous sert pour un prélèvement de sérum fait à des temps différents après la coagulation du sang. Le sérum a été chaque fois centrifugé pour éliminer les globules rouges. Le dosage d'azote protéidique a fourni les résultats suivants :

	Protéides par litre de sérum en grammes	Variation en p. 100
Sérum séparé du caillot	—	—
Deux heures après la prise de sang	62,2	
Quatre heures après la prise de sang	62,2	
Huit heures après la prise de sang	62,0	—0,32
Vingt heures après la prise de sang	62,2	

Le dosage de quarante-huit heures n'a pas pu être pratiqué, le plasma étant déjà légèrement coloré par l'hémoglobine.

Il résulte de cette expérience, comme l'a vu déjà Bing, que la concentration du sérum en protéides totaux ne dépend pas du temps de contact de celui-ci avec le caillot, les résultats restent constants quand on sépare le sérum de deux a vingt heures au moins après la prise de sang. Il est évident que cela ne s'applique qu'aux sangs conservés dans des conditions identiques.

b) Le sérum provenant du sang total est plus pauvre en protéides que celui qui provient du plasma séparé des glo-

BULES ROUGES. — Nous avons vu que le sérum est sensiblement plus pauvre en protéides que le plasma du même sang. Par les expériences suivantes, nous avons voulu savoir si le sérum provenant de la coagulation du sang total conserve en protéides la même concentration que le sérum résultant de la coagulation du plasma séparé des globules rouges avant la coagulation. Ce procédé nous permettrait de décider s'il existe un échange d'eau entre les globules et le plasma au cours de la coagulation et nous expliquerait la diminution très forte de la concentration en protéides du sérum que nous avons constatée.

EXPÉRIENCE N° 46. — On saigne un lapin à la carotide. Une partie du sang est recueillie dans un tube paraffiné et rapidement centrifugée. On répartit le plasma ainsi obtenu en deux tubes à essai dans lesquels on le laisse coaguler. Nous recueillons, d'autre part, une égale quantité de sang directement dans deux tubes à essai. On pratique une première analyse de chacun des deux sérums deux heures après la prise de sang, et une deuxième vingt-quatre heures plus tard. Les deux analyses faites à vingt-deux heures d'intervalle nous montrent que la teneur en protéides du sérum ne varie pas plus au contact du caillot pour celui qui provient du plasma que pour celui qu'on retire du sang total, comme nous l'avons constaté déjà pour le sérum du sang total.

	PROTÉIDES par litre de sérum en grammes	VARIATIONS en p. 100
Sérum du sang, séparé :		
Deux heures après la prise de sang	64,9	
Vingt-quatre heures après la prise de sang	64,9	
Sérum du plasma, séparé :		
Deux heures après la prise de sang	68,9	+ 6,2
Vingt-quatre après la prise de sang	68,8	+ 6,0

L'expérience n° 47 est faite de la même façon que l'expérience précédente, sauf que nous avons fait le dosage sur le sérum séparé quatre heures après la prise de sang.

	PROTÉIDES par litre de sérum en grammes	VARIATION en p. 100
Sérum provenant du sang total	71,0	
Sérum provenant du plasma	72.3	+ 1,8

Ces deux expériences nous montrent que le sérum du sang total est moins riche en protéides que celui du plasma. Il se produit donc au cours de la coagulation, un passage d'eau du globule vers la phase extérieure. La perméabilité de la paroi globulaire n'est pas complètement altérée après coagulation et elle doit permettre d'observer une diminution de la concentration en protéides du sérum si l'on change la concentration moléculaire du plasma.

c) Une modification de la concentration moléculaire du plasma avant coagulation du sang agit sur le taux de protéides sériques.

Expérience n° 48. — On saigne un lapin à la carotide. Le sang est séparé en deux tubes à essai. Dans un tube on ajoute 1 cent. cube d'une solution de NaCl à N/10 pour 10 cent. cubes de sang, dans l'autre 1 cent. cube d'une solution de NaCl N pour la même quantité de sang. On mélange bien et on ferme les tubes au caoutchouc pour éviter l'évaporation. On sépare le sérum au bout de vingt heures. Nous avons ajouté dans cette expérience le sel en solution pour éviter l'hémolyse des globules rouges.

	Protéides par litre de sérum en grammes	Variation en p. 100
	—	—
Sérum du sang additionné de NaCl à N/10 . .	52,9	
Sérum du sang additionné de NaCl N.	48,1	— 8,1

On voit donc que la paroi globulaire garde encore les propriétés caractéristiques d'une membrane semi-perméable et l'eau des globules passe dans le plasma, plus facilement que les sels du plasma dans les globules.

d) La diminution de la concentration en protéides du sérum par rapport au plasma relève de deux mécanismes différents. — La diminution du taux des protéides du sérum par rapport au plasma est par conséquent due non seulement à la formation de la fibrine, mais aussi à la dilution du sérum par l'eau des globules. On peut étudier ces deux phénomènes simultanément sur un même sang si, en comparant le sérum obtenu par coagulation du sang total avec celui du plasma séparé des globules rouges avant coagulation, on détermine

la dilution du sérum due à la dilution par l'eau de globules. Si nous comparons les chiffres obtenus par dosage du plasma frais et du sérum provenant de ce plasma, nous déterminons la diminution due à la coagulation de la fibrine Voici deux de nos expériences.

EXPÉRIENCE N° 49 faite sur le sang de lapin.

	PROTÉIDES par litre en grammes	DIFFÉRENCE en p. 100
Plasma du sang non additionné d'anticoagulants	74,0	
Sérum provenant de ce plasma	72,2	— 2 43
Sérum provenant du sang total	71,0	— 4,05

EXPÉRIENCE N° 50 faite aussi sur le sang de lapin.

Plasma du sang non additionné d'anticoagulants	60	
Sérum provenant de ce plasma	57.5	— 4,16
Sérum provenant du sang total	55,2	— 8,00

Dans les conditions de nos expériences, la diminution du taux de protéides au cours de la coagulation est environ deux fois plus grande en présence de globules rouges que dans le plasma seul.

La différence du taux de protéides entre le plasma et le sérum provenant de ce plasma, correspond à l'élimination de la fibrine. Cette différence dans nos expériences varie de 2 à 5 grammes par litre, ce qui fait de 200 à 500 milligrammes de fibrine par 100 cent. cubes de plasma, chiffres sensiblement comparables à ceux qu'on trouve en dosant directement la fibrine par d'autres méthodes. Cette estimation de la quantité de fibrine est probablement plus sûre que celle des auteurs américains, basée sur la recalcification du plasma du sang préalablement décalcifié par l'oxalate. Par cette méthode, l'addition d'anticoagulants ne dilue pas le plasma et écarte les causes d'erreur dues à la difficulté très grande qu'entraîne la séparation de la fibrine des autres protéides.

Starlinger [180], dans deux travaux très documentés, critique sévèrement les différentes méthodes de dosage de la fibrine. Le fibrinogène qu'on dose par recalcification n'est pas

identique au fibrinogène naturel qui se forme au moment de la coagulation spontanée du sang. D'après lui, la meilleure façon de doser le fibrinogène consiste à faire la comparaison réfractométrique du plasma et du sérum provenant de ce plasma.

Guillaumin [66] estime qu'il est impossible de chercher à mesurer le fibrinogène par différence entre le sérum du sang et le plasma du même sang additionné d'anticoagulant salin, qui apporte une perturbation dans la répartition de l'eau entre les globules et le plasma. Ajoutons que la comparaison doit être faite entre le plasma du sang non modifié et le sérum provenant de ce plasma, et non pas le sérum du sang total.

e) C'est le départ de l'acide carbonique qui régit la dilution du sérum au cours de la coagulation. — Pour étudier le mécanisme de la dilution du sérum au moment de la coagulation, nous avons pensé que le départ de l'acide carbonique qui se produit constamment dès que le sang est exposé à l'air, pouvait introduire une perturbation dans la concentration moléculaire du sang. Pour que la dilution du sérum puisse se manifester, c'est la concentration moléculaire qui entraîne la dilution du sérum, celui-ci augmente par rapport à celle des globules rouges. D'autre part, d'après la théorie déjà ancienne de Hamburger [71 et 73], il ressort que quand le sang s'enrichit en CO^2, le volume globulaire augmente et le plasma se concentre. Le phénomène inverse se produit au moment du départ de l'acide carbonique du sang.

Les expériences que nous avons faites nous ont apporté une confirmation partielle de cette théorie. Voici comment nous avons procédé.

Expérience n° 51, faite sur le sang de lapin. — On prélève par ponction du cœur chez un lapin, 20 cent. cubes de sang avec une seringue dans laquelle nous avons introduit, avant l'opération, quelques cent. cubes d'huile de paraffine pour éviter le contact du sang avec l'air. Le sang est porté dans un tube à centrifugation contenant 0 c. c. 10 d'une solution d'héparine à 5 p. 100, recouverte d'une couche de 3 centimètres d'huile de paraffine. On introduit l'aiguille de la seringue jusqu'au fond du tube, de telle sorte que le sang qui

arrive dans le tube se trouve placé toujours sous une couche d'huile. Dans un deuxième temps, on prélève du sang avec une seringue ordinaire et on le verse dans un verre qu'on place dans un exsiccateur contenant au fond une solution de potasse caustique à 1 p. 100 pour absorber l'acide carbonique. On ferme bien l'exsiccateur et on laisse le sang ainsi pendant trois heures à la température du laboratoire. On conserve pendant le même temps à la même température, le sang recouvert d'huile. Puis on centrifuge les deux tubes et on analyse le plasma.

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATION en p. 100
Sérum sous huile de paraffine	68,1	—
Sérum conservé dans une atmosphère privée de CO^2	66,9	—1,76

On voit que réellement le sang qui a perdu plus d'acide carbonique est plus pauvre en protéides. Nous disons plus d'acide carbonique car l'huile de paraffine n'arrête pas complètement le départ de l'acide carbonique.

Nous avons répété ces expériences plusieurs fois sur le plasma avec des résultats identiques. Ensuite nous avons vérifié que le sérum se comporte de façon identique. Pour en être sûr, nous avons fait plusieurs témoins pour éliminer l'action de la dessiccation ou humidification du sérum. Voici une de nos expériences.

Expérience n° 52, faite sur le sang de mouton. — On prélève une cinquantaine de cent. cubes de sang de mouton qu'on répartit par 10 cent. cubes environ de la façon suivante : 10 cent. cubes sont recueillis dans un tube à essai bouché au caoutchouc. Les 40 autres cent. cubes sont répartis par 10 cent. cubes dans des boîtes de Petri qui sont successivement mises ouvertes dans un exsiccateur bien fermé, mais dans lequel on ne fait pas le vide. Pour la première, on place au fond de l'exsiccateur une couche d'eau pour étudier l'influence de la vapeur d'eau ; pour la deuxième au lieu d'eau on met une couche d'acide sulfurique pour voir l'influence de la dessiccation, pour la troisième une solution à 2 p. 100 de potasse caustique qui absorbera l'acide carbonique et pour la quatrième, on fait passer un courant d'acide carbonique.

Tous ces échantillons sont ensuite centrifugés et on dose les protéides du sérum par la méthode habituelle.

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATIONS en p. 100
	—	—
Sérum du sang conservé dans les tubes à essai bouchés au liège	78,2	
Sérum du sang conservé dans une atmosphère de vapeur d'eau	78,2	0
Serum du sang conservé dans une atmosphère sèche.	80,9	+ 3,45
Serum du sang conservé dans une atmosphère d'acide carbonique	75,1	— 3,96
Sérum du sang conservé dans l'atmosphère privée de CO^2.	74,2	— 5,13

Il est nécessaire de faire la séparation du sérum au moins six à sept heures après la prise de sang pour se placer dans des conditions similaires pour tous les échantillons. Il est évident que dans une boîte de Petri CO^2 part très vite, alors qu'il lui faut plus de temps pour s'éliminer d'un tube.

Cette expérience montre que le sang conservé dans une boîte de Petri en atmosphère humide présente le même taux de protéides que le sang témoin conservé dans des tubes à essai bouchés. La dessiccation, d'autre part, augmente la concentration du sérum en protéides, comme il fallait s'y attendre. Si le départ d'acide carbonique produit une dilution du plasma, un excès de CO^2 provoque le même effet. Il existe par conséquent une concentration en CO^2 du sang qui correspond au plus fort volume globulaire. Une diminution ou une augmentation de la pression partielle de ce gaz dans le sang provoque la diminution du volume globulaire et la dilution du plasma ou du sérum par l'eau globulaire. L'hypothèse de Hamburger ne s'applique donc que dans les limites très étroites correspondant au voisinage de la pression physiologique normale de CO^2.

La pression de CO^2 augmente, le plasma ou le sérum se diluent sans qu'on puisse invoquer une précipitation partielle des protéides par acidification. En effet, le pH du sérum conservé dans une atmosphère de CO^2 ne baisse pas, dans nos expériences, au-dessous de 7,2-7,3, pH normal du sang.

Nous pouvons dire, en définitive, que le départ de l'acide carbonique diminue la teneur en protéides du sérum et que la dessiccation l'augmente.

PARTIE HISTORIQUE

Rôle des anticoagulants dans le dosage et la répartition des divers constituants du sang entre les globules et le plasma.

Après avoir étudié l'action perturbatrice des anticoagulants sur divers dosages, nous allons passer en revue rapidement la littérature qui existe sur ce sujet.

I. — Dosages de protéides.

Nous n'avons pas l'intention de passer en revue la longue liste des travaux qui ont nécessité le dosage des protéides du plasma sanguin pour des recherches chimiques, physiques, médicales et physiologiques. Nous nous bornerons à examiner les méthodes employées pour séparer le plasma, les répercussions que l'usage des anticoagulants entraîne sur l'exactitude des résultats obtenus et nous nous efforcerons d'expliquer les divergences de certains de ces travaux en signalant les causes d'erreur qui les ont provoquées.

On peut classer les méthodes de dosage des protéides du plasma en quatre groupes :

1° Méthodes gravimétriques : pesée des protéides après précipitation par un réactif approprié, le plus souvent l'acide trichloracétique et lavages ultérieurs pour enlever les impuretés.

2° Méthodes volumétriques : dosage de l'azote protéidique par la méthode de Kjeldahl. C'est de beaucoup la méthode la plus simple et la plus précise, c est aussi la plus répandue.

3° Méthode colorimétrique proposée par Wu ; libération de la tyrosine par hydrolyse des protéides et dosage colorimétrique de cet acide aminé.

4° Méthodes réfractométriques : mesure de l'indice de réfraction du plasma.

Nous ne croyons pas devoir examiner tous ces travaux suivant cette classification, car ce qui nous intéresse c'est que,

presque toujours, les auteurs ne se sont pas préoccupés de la façon dont le plasma était obtenu, et c'est là le point spécial sur lequel nous voulons attirer l'attention.

Pourtant, il existe quelques travaux traitant de l'action perturbatrice des anticoagulants sur les dosages de protéides.

Cullen et Van Slyke [30] ont remarqué que des variations de concentration du sang en oxalate entraînent des variations du taux d'azote total du plasma. Ils proposent, pour avoir des résultats comparables, d'utiliser toujours la même concentration en oxalate. Cependant, nous avons vu que le sang ne répond pas toujours d'une façon identique à l'addition d'une dose constante d'anticoagulant et ces variations individuelles ne sont pas négligeables.

Peters, Eisenman et Bulger [143] en 1925, ont trouvé moins de protéides dans le plasma du sang oxalaté que dans le sérum provenant du même sang. Ils attribuent ce résultat paradoxal à l'action de l'anticoagulant.

Guillaumin [66] en 1930, indique que l'addition d'anticoagulant au sang apporte une modification dans la distribution de l'eau entre les globules et le plasma. Il le démontre par des dosages de chlorures globulaire et plasmatique.

Gaeblér [56] en 1932, remarque que le plasma du sang additionné d'anticoagulants salins contient moins d'azote total que le sérum. L'auteur explique ce fait par l'action diluante des sels ajoutés.

Enfin, Blitstein [16] en 1935, dans un long travail, a étudié l'action des anticoagulants dans les dosages courants que l'on pratique sur le sang en clinique. Il confirme pour les anticoagulants salins les résultats des auteurs précités : tous ces corps diminuent le taux des protéides du plasma. Comme terme de comparaison, il se sert du sérum du sang défibriné, ce qui entraîne forcément une inexactitude que l'auteur reconnaît lui-même. En revanche, il ne trouve pas de différence dans le taux protéidique du plasma quand il utilise le sang hépariné, liquoïdé ou hirudiné, et ceci parce que ces trois corps, utilisés à de très petites doses donnent, comme nous l'avons vu, une dilution du plasma beaucoup plus faible que les anticoagulants salins.

Malgré l'évidence de ces travaux, de nombreux auteurs, comme auparavant, attachent si peu d'importance aux anticoagulants utilisés, qu'ils n'en indiquent même pas le nom, ni la dose employée. On peut citer parmi ceux-là, dans des travaux récents : Bruger et Poindexter [22] et Leichsering et ses collaborateurs [112] qui ont fait des dosages de protéides et des mesures de volume globulaire sur le sang de chien.

Cependant, la plupart des auteurs précisent la nature de l'anticoagulant utilisé, mais n'en indiquent pas la dose. Il est évident que tous les résultats de dosages obtenus par eux restent au-dessous de la réalité. Une différence d'origine du sang et surtout la moindre variation dans la dose d'anticoagulant apportent des troubles considérables. L'absence de précision dans les doses employées laisse croire que, pour chaque expérience, celle-ci varie et qu'il en est de même de l'erreur commise. Ces considérations s'appliquent aux travaux de Barnett, Jones et Cohn [5] qui ont employé le citrate de soude. Ne mesurant pas le volume globulaire, il leur est impossible de rapporter leurs résultats au volume du sang total, pour corriger l'action de l'anticoagulant. Ne serait-ce pas à cette raison qu'il faille attribuer la non-concordance de leurs observations avec celles d'autres auteurs, Whipple et ses collaborateurs par exemple, qui, au contraire d'eux, trouvent une diminution des protéides sanguins par la plasmophorèse ? De même Linder, Lundsgaard et Van Slyke [118] recherchent la teneur en protéides du plasma chez les sujets normaux et les néphrétiques, sans préciser la dose d'oxalate utilisée. Swanson et Smith [182] trouvent que le plasma sanguin du rat s'enrichit en protéides avec l'âge de l'animal, mais leurs chiffres restent certainement au-dessous du taux réel, car ils utilisent le plasma oxalaté en indiquant tout juste que l'anticoagulant a toujours été employé de la même manière.

II. — Dilution du sang après absorption d'eau.

Quand il s'agit de phénomènes entraînant de faibles variations dans la teneur des protéides, comme par exemple la dilution du sang après ingestion d'eau, l'erreur commise

au cours de la séparation du plasma peut être supérieure à la différence cherchée. C'est probablement pour cette raison que sur ce sujet les résultats sont les plus contradictoires. Certains auteurs comme Haldane et Priestley [69] en 1916, Priestley [155] en 1916 et 1921, ne trouvent pas de différence dans la concentration du sang en protéides avant et après absorption d'eau ou d'eau salée. Ils n'indiquent pas d'ailleurs la technique opératoire. Par contre, Bayliss et Fee [7], sans donner plus de détails sur la technique, observent des résultats contraires. Rioch [160], en travaillant sur le sang recueilli dans des tubes paraffinés et non additionné d'anticoagulant, donc en évitant les erreurs que nous avons signalées, constate une chute de la concentration des substances dissoutes dans le plasma après ingestion d'eau Aux mêmes résultats arrivent Adolph en 1921, Marx en 1925-1927, Marx et Mohr [132] en 1927, Dresel et Leitner [39] en 1928, Brahn et Bilschowsky en 1928.

Hemingway, Collins et Bernhart [84] ont étudié la dilution du sang à la suite de l'injection intraveineuse d'eau physiologique chez le chien normal et le chien éviscéré. Le degré de dilution du sang a été évalué par trois méthodes différentes : 1° par dosage d'hémoglobine, 2° par dosage des protéides du plasma, 3° par tests des colorants vitaux. Ils remarquent d'ailleurs que ces trois procédés ne donnent pas une réponse identique. Le dosage d'hémoglobine fournit des résultats moins élevés que ceux qu'on obtient par dosage des protéides plasmatiques et par ces derniers moins encore que par les tests de colorants vitaux. C'est ainsi que dans une expérience, pratiquée deux heures après l'injection d'eau, les auteurs trouvent par dosage de l'hémoglobine une dilution du sang de 20 p. 100, de 40 p. 100 par dosage des protéides plasmatiques et de 70 p. 100 par l'emploi de colorants. Ils en arrivent à cette conclusion qu'il est impossible de savoir laquelle de ces trois méthodes donne un résultat exact et même si l'une d'entre elles convient. Ajoutons encore que pour opérer le dosage des protéides et pour utiliser les colorants vitaux, ils oxalatent le sang avec une solution qu'ils qualifient d'isotonique sans autre précision. Pour le dosage de l'hémoglobine, ils ajoutent au sang de l'oxalate en poudre sans indiquer la

dose, bien qu'à la vérité, celle-ci ait ici peu d'importance puisqu'ils opèrent sur le sang total.

Smirk [**173**], d'après ces expériences, admet qu'il existe réellement une dilution du sang après ingestion d'eau. Mais la méthode qu'il utilise enlève une grande valeur à ses résultats. En effet, il procède à la détermination du volume globulaire, au dosage du chlore et de l'hémoglobine en héparinant le plasma, opération qui provoque, comme nous le savons, une faible dilution de cette humeur. Pour le dosage des protéides du plasma, il opère sans indiquer le taux d'oxalate qu'il emploie et sans tenir compte des perturbations beaucoup plus importantes que comporte cet anticoagulant. La dilution du plasma a donc été différente dans chaque cas. De plus, toute correction dans le chiffre des protéides devient impossible puisque la mesure du volume globulaire est faite sur le plasma hépariné et le dosage d'azote protéidique sur le plasma oxalaté.

Nous retrouvons aussi l'utilisation de deux anticoagulants dans les recherches sur la plasmophorèse faites par Holman, Mahoney et Whipple en 1934 [**90**]. Ces auteurs ont dosé les protéides du plasma sur le sang citraté à la dose de 1 cent. cube d'une solution de citrate « concentrée » pour 50 cent. cubes de sang, alors que les lectures à l'hématocrite ont porté sur le sang oxalaté avec une solution isotonique d'oxalate.

Il est évident que cette technique malheureuse ne permet de calculer ni le taux réel, ni la quantité de protéides dans un échantillon donné de sang. D'ailleurs Whipple et ses collaborateurs [**126** et **146**] ont pressenti la défectuosité de leur méthode et dans leurs expériences ultérieures, ils ne font usage que d'un seul anticoagulant pour toutes leurs mesures, à savoir le citrate de soude en solution saturée à raison de 1 cent. cube pour 100 cent. cubes de sang. Leurs expériences montrent que chez le chien, une teneur du plasma en protéides inférieure à 4 p. 100 provoque des œdèmes et des accidents variés, alors qu'au-dessus de ce taux, l'organisme commence à mettre des protéides en réserve. En réalité, le taux critique est de 5 à 10 p. 100 plus élevé, en raison de l'action diluante du citrate de soude sur le plasma.

III. — Mesure du volume total du sang.

Plusieurs méthodes ingénieuses ont été proposées pour mesurer le volume total du sang, du plasma ou des globules rouges de l'organisme.

Pour le volume total du sang, le procédé le plus simple consiste à faire une saignée complète de l'animal [**21**], mais même en pratiquant un lavage des vaisseaux, on n'est jamais sûr d'en avoir extrait la totalité.

L'injection de colorants vitaux dans la circulation et la détermination quantitative de ces substances dans un volume donné de sang, prélevé quelques instants après l'injection du colorant permettrait, d'après Keith, Rowntree, Geraghty, inventeurs de la méthode [**100**], de déterminer le volume total du sang. A la place des colorants vitaux, on a proposé les immun-sérums : Dreyer et Ray [**40**] se sont servis du sérum agglutinant, Behring [**10**] du sérum antitoxique, Todd, White et Ashby [**184**] du sérum hémolytique, Culberston [**29** *bis*] de sérum précipitant. Ces méthodes ne sont pas sans reproches. Sans parler de la fixation possible de ces substances dans les tissus de l'organisme, cause d'erreur à laquelle les différents auteurs ont essayé de remédier, l'emploi d'anticoagulant pour la séparation du plasma entraîne des erreurs considérables. Le plasma, dilué par l'action de l'anticoagulant, renferme une quantité du test injecté inférieure à la réalité, et de ce fait le volume du plasma calculé est trop fort. On n'élimine pas non plus cette cause d'erreur en travaillant sur le sérum, car premièrement, l'eau globulaire, comme nous l'avons vu, dilue le sérum au moment de la coagulation, et deuxièmement la détermination du volume du plasma par rapport à celui des globules rouges à l'aide de l'hématocrite, oblige à additionner le sang d'anticoagulant. Dès lors, le volume du plasma trouvé à l'hématocrite ne correspond pas au volume du sérum, et l'on voit quelle répercussion cette pratique peut avoir sur le calcul du volume du sang total.

Cutting et Cutter [**31**] déterminent le volume total du sang par perfusion en utilisant, pour les mesures du volume plas-

matique à l'hématocrite, le sang additionné d'une solution saturée de citrate. Le volume du plasma ainsi calculé par rapport à la surface totale du corps, est loin d'être correct.

Powers, Bowie et Howard [153] essaient de mesurer le volume total du sang, ceux du plasma et des globules rouges chez le chien. Pour cela, ils utilisent la méthode des colorants vitaux. Pour les mesures à l'hématocrite et pour les dosages colorimétriques, ils recueillent le sang sur du citrate de sodium sec à raison de 3 gr. 6 par litre de sang. Ils trouvent le rapport du poids du sang total, à celui de l'animal égal à 11,91 p. 100. En travaillant aussi sur le chien, Harris [78] trouve, pour ce rapport, une valeur de 7,6 p. 100. L'anticoagulant employé par cet auteur était l'oxalate en poudre. Ce n'est pas parce qu'il a tenu compte de l'action diluante de l'oxalate qu'Harris a trouvé un rapport plus faible que celui des auteurs précédents, mais par suite de l'introduction d'une correction portant sur le fait qu'une partie du colorant passe dans la lymphe et les tissus ou s'élimine par l'urine.

En réalité, le rapport du volume du sang total au poids du corps serait encore plus faible si les auteurs avaient pris en considération l'action des anticoagulants.

IV. — Dosage de la fibrine.

Nous ne parlerons pas des méthodes de dosage anciennes qui ont été reconnues peu satisfaisantes, mais nous examinerons seulement les plus récentes. Presque toutes sont basées sur la recalcification du plasma provenant du sang préalablement décalcifié. Etant donné la petite quantité de fibrine contenue dans le sang, l'erreur commise est trop faible pour que les auteurs aient perçu l'influence des anticoagulants.

Cullen et Van Slyke [30] utilisent comme décalcifiant l'oxalate de potassium en poudre à raison de 5 grammes p. 1.000. Wu se sert du même sel, mais à la dose de 2 à 6 grammes p. 1.000. Avec ces méthodes, une première cause d'erreur est due à l'utilisation du décalcifiant en poudre et cette erreur est plus grande que par le procédé de Foster et Whipple [53] ou celui de Schultz et ses collaborateurs [169]

qui emploient l'oxalate en solution de 1 à 2 p. 100 et qui, par conséquent, modifient moins le volume globulaire.

Une seconde cause d'erreur provient du procédé d'isolement de la fibrine. Pour cette opération, une quantité déterminée de plasma est introduite dans une solution contenant un excès de sels de calcium. La fibrine précipitée est séparée soit par centrifugation, soit par expression du culot, soit enfin par enroulement de la fibrine sur une baguette de verre. La fibrine est ensuite rincée à l'eau salée et évaluée par pesée directe ou par dosage de l'azote.

Cette méthode manque de précision car on n'est pas sûr d'avoir précipité toute la fibrine, ni de ne pas avoir apporté d'autres protéides adsorbés sur celle-ci. Wu [198] d'une part, Jones et Smith [99] d'autre part, pour améliorer le rendement en fibrine ajoutent de la céphaline qui favorise la coagulation de cette substance. Ces deux derniers auteurs indiquent que la quantité de fibrine précipitée diffère avec le pH du milieu.

Starlinger [180], dans deux travaux très importants, étudie en détail les différentes méthodes de dosage de la fibrine. D'après ce savant, les dosages basés sur le principe de la recalcification du sang oxalaté comme ceux de Cellen et Van Slyke [30], de Gram [62], de Foster et Whipple [53], de Howe [85], de Lester [114], de Leendertz et Gromelsky [110], de Pfeiffer et Koster [144], de Porgès et Spiro [152], n'indiquent que la teneur du plasma en « fibrine saline » qui n'est pas identique à celle que l'on peut obtenir par coagulation spontanée du sang.

Une autre méthode consiste à se servir du procédé peu correct de comparaison entre le plasma et le sérum d'un même sang. En effet, Starlinger a vu que la concentration en protéides du sérum diffère suivant qu'il provient du sang ou du plasma. D'après lui, la meilleure façon de doser la fibrine est la méthode réfractométrique : celle-ci consiste à comparer au réfractomètre le plasma additionné d'anticoagulant après séparation des globules rouges et le sérum provenant de ce plasma. La différence trouvée indique la quantité de fibrine contenue dans le plasma. Guillaumin [66], de même, signale

qu'il est impossible de doser la fibrine par différence entre le sérum et le plasma salifié.

D'après tout ce que nous savons de l'action des anticoagulants, il ressort que la meilleure méthode de dosage de la fibrine consiste à mesurer la teneur relative en protéides du plasma et du sérum provenant de ce plasma, sans se servir d'anticoagulants.

V. — Rapport entre la sédimentation globulaire et la teneur du sang en divers protéides.

Ordinairement, on mesure la vitesse de sédimentation des globules rouges sur le sang citraté, à 3 ou 4 p. 1.000.

Nous trouvons une observation intéressante dans le travail de Ström [181] qui compare la vitesse de sédimentation des globules dans le sang hépariné et le sang citraté d'un même individu. Cet auteur trouve une vitesse de sédimentation plus rapide dans le sang citraté et il en conclut que l'héparine doit altérer les protéides plasmatiques. Il nous semble beaucoup plus logique de considérer que la vitesse de sédimentation est fonction de la viscosité différente du plasma citraté et du plasma hépariné, ce dernier, moins dilué que le premier, jouissant d'une viscosité plus grande.

Nombreux sont les auteurs qui ont cherché un rapport entre les divers protéides plasmatiques et la vitesse de sédimentation globulaire. D'après les uns, dont Snapper [175], ce phénomène est régi par la fraction globulinique, y compris le fibrinogène. Au contraire, Reiche et Fretwurst [157] ne trouvent aucun rapport entre la vitesse de sédimentation et la teneur du plasma en divers protéides. Leurs dosages ont été faits sur le sang fluoré sans indication de titre et nous savons que cet anticoagulant donne les erreurs les plus considérables ; notons encore que les doses de fluorure ne sont pas indiquées et que si elles n'ont pas été les mêmes à chaque détermination, il faut vraiment accueillir ces résultats avec réserve.

Swedin [183], qui opère sur le sang additionné d'une solution hypertonique de citrate, ne tient pas plus compte de l'action du sel employé sur le dosage des protéides.

VI. — Etude de la distribution de différentes substances entre le plasma et les globules rouges.

Nombreux sont les auteurs qui se sont préoccupés de la répartition, entre le plasma et les globules rouges, de différentes substances, soit qu'elles existent normalement dans le sang, soit qu'on les y ajoute. Le plus grand nombre de travaux sur ce sujet ont été faits sur le sang additionné d'anticoagulants. Le problème est ici plus complexe que pour les protéides, substances non diffusibles, car, outre l'eau, plusieurs corps peuvent passer des globules rouges dans le plasma et *vice versa*. Pour les corps très facilement diffusibles tels que l'urée qui, comme nous l'avons vu, ne modifie que peu ou pas le volume globulaire, l'action diluante de l'anticoagulant influe peu sur la concentration plasmatique de ces corps. Cependant si l'on calcule le rapport de l'urée globulaire et de l'urée plasmatique, ce rapport sera faussé par diminution du volume globulaire due à l'anticoagulant.

Glucose. — Folin [**49**], pour l'étude de la répartition du glucose dans le sang, conseille d'utiliser l'oxalate de potassium ou de lithium. De même, Benedict et Behre [**11, 12**] prennent l'oxalate de sodium en poudre.

Le travail d'Olmsted [**141**], où l'on trouve des conclusions surprenantes, est un type de ces travaux où l'interprétation des résultats faussés par l'action des anticoagulants, donne lieu à des erreurs manifestes. L'auteur procède de la manière suivante : un premier dosage du glucose est pratiqué sur le sang total et sur le plasma provenant de ce sang par centrifugation rapide. Le volume globulaire est déterminé à l'hématocrite sur le sang oxalaté, sans indication de titre. Cette mesure n'est faite qu'une fois pour toutes et cependant l'auteur indique qu'il trouve le même volume globulaire pour le sang frais et pour le sang oxalaté, ce qui est assurément erroné. Le volume plasmatique du sang frais est de beaucoup inférieur au volume plasmatique du sang oxalaté. La teneur en glucose plasmatique du sang frais calculée sur les données

de cette expérience est beaucoup plus forte, ce qui explique qu'en soustrayant cette valeur de la teneur en glucose du sang total, il n'en reste plus pour les globules. Ensuite, quand l'auteur dose le sang oxalaté dont le volume globulaire est plus ou moins correctement évalué, le glucose « réapparaît » dans les globules. L'auteur explique ce phénomène en disant que l'oxalate modifie la perméabilité de la paroi globulaire vis-à-vis du glucose, conclusions qui nous paraissent mal fondées.

Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que Klinghoffer [**103**], en répétant les expériences d'Olmsted, n'ait pas pu en confirmer les résultats. La raison de cette divergence est simple, elle résulte de ce que Klinghoffer a pris soin de mesurer le volume globulaire pour chaque dosage.

Le rapport glucose globulaire/glucose plasmatique varie suivant les auteurs. Folin et Svedberg [**51**] et Folin et Andreen l'estiment égal, chez l'homme normal, à 0,6, Somogui [**176, 177**], Power et Ege à 0,7. Ces auteurs ont travaillé sur le sang additionné d'anticoagulants salins dont Ege en 1920 a fait ressortir l'influence sur les dosages du glucose. Le rapport devient plus élevé quand on dose le sang hépariné, par conséquent avec moins d'erreurs qu'avec les sels anticoagulants. Par ce procédé, Tremble et Maddock [**187**], Spannuth et Power [**178**] trouvent le rapport glucose globulaire/glucose plasmatique à 0,84. MacKay [**121**] en 1926 arrive sensiblement aux mêmes chiffres. En rapportant le glucose trouvé dans les deux phases sanguines à l'eau qui y est respectivement contenue, MacKay trouve que la concentration de ce corps est la même dans l'eau globulaire et dans l'eau plasmatique. La répartition du glucose entre les deux phases se trouve donc régie par la simple diffusion dans l'eau à travers la paroi globulaire. Klinghoffer [**103**] d'une part, Neuwith [**139**] d'autre part, arrivent aux mêmes conclusions. D'après ces travaux, le rapport des concentrations du glucose dans l'eau globulaire et dans l'eau plasmatique est égal à I ou en est très près. Nous ne savons que très peu de chose sur la vitesse de diffusion du glucose à travers la membrane globulaire et sur la rapidité avec laquelle s'établit l'équilibre

entre les globules et le plasma, quand survient un changement brusque de la concentration en glucose dans une des deux phases. Il importe donc en clinique d'éviter pour le dosage du glucose plasmatique ou globulaire l'emploi des anticoagulants. Pour étudier la répartition de ce corps, les dosages faits sur le sang des diabétiques additionné des sels anticoagulants, sont sujets à critique. Nous devons reconnaître que l'utilisation de plus en plus fréquente de l'héparine pour ce dosage, comme l'ont fait Brull [**23**], Power et Peterson [**154**], élimine en grande partie les causes d'erreur.

Répartition des chlorures entre les globules et le plasma. — Elle a fait l'objet d'innombrables travaux. Nous possédons toute une série d'observations au sujet de l'action des anticoagulants sur la répartition du chlore. Eisenman [**44**] en 1927, remarque que l'oxalate modifie la repartition des chlorures dans le sang, et que le plasma du sang oxalaté est ordinairement plus pauvre en chlorures que le sérum du sang défibriné. Il propose donc de toujours travailler sur le sang défibriné.

Guillaumin [**66**] en 1930, observe aussi que les anticoagulants salins agissent par dilution du plasma et que chacun d'eux possède une action spécifique. Avec le citrate tribasique, le chlore va vers les globules, avec le fluorure et l'oxalate il suit le chemin inverse. L'auteur conseille d'utiliser l'hirudine ou à défaut des doses minima d'anticoagulants. Laudat a fait les mêmes constatations. Les observations de Guillaumin sur le citrate ne sont pas confirmées par Raszeja et Slavinsky [**156**] qui ne sont pas arrivés à constater le déplacement du chlore dans le sang citraté. Les deux auteurs polonais notent simplement une rétention du chlore par les globules dans le sang citraté ou additionné de doses faibles de chlorure de sodium. Par contre, dans le sang oxalaté, fluoré, ou mélangé à des doses plus fortes de chlorure de sodium, le passage du chlore entre les globules et le plasma se ferait librement.

Blitstein [**16**] a confirmé les observations d'Eisenman pour l'oxalate. D'après lui, le fluorure, le citrate et aussi le sulfate

de zinc agissent de la même manière. Toutes ces substances ajoutées au sang diminuent le taux des chlorures plasmatiques par dilution du plasma. L'auteur conseille d'utiliser pour le dosage de chlorure l'héparine, l'hirudine ou le liquide qui, d'après lui, n'altéreraient pas le taux des chlorures plasmatiques. Cela n'est probablement pas tout à fait exact, car, nous l'avons vu pour les protéides, ces derniers anticoagulants faussent aussi les résultats mais à un moindre degré et quand on opère sur de faibles quantités de substances, il devient difficile de reconnaître l'erreur.

Malgré la publication de ces données précises sur l'influence des anticoagulants, on pratique les dosages de chlorures sanguins en se servant de l'oxalate, souvent sans en indiquer le taux. Wu [**199**], dans un travail important où il décrit plusieurs méthodes de dosage, indique que pour l'étude de la répartition des diverses substances entre les globules et le plasma, il faut utiliser le plasma du sang oxalaté, mais il n'indique point le taux à employer D'après lui, le dosage pratiqué sur le plasma a plus de valeur au point de vue clinique que s'il l'est sur le sérum. Cette affirmation nous paraît excessive quand on utilise l'oxalate en poudre.

Tout ce que nous avons dit des chlorures s'applique, avec quelques modifications, aux autres constituants sanguins. La répartition de l'acide urique de l'azote peptidique et en général de l'azote non protéidique, s'étudie fréquemment sur le sang salifié. Comme on pouvait s'y attendre, les résultats de ces travaux sont rarement concordants. Wu [**199**], Folin et Berglund [**50**], Folin et Svedberg [**51**], de Martens [**131**] ne donnent pas d'indications sur les doses d'anticoagulants utilisées. Pourtant dans ce groupe de corps entrent des substances à poids moléculaire élevé qui ne doivent pas être facilement diffusibles. De même, Lemeland et Deletang se servent [**113**], pour l'étude de glutathion dans les globules et le plasma, de sang fluoré, ce qui fausse notablement les résultats.

Les anticoagulants dans le dosage du phosphore amènent encore plus de troubles et provoquent des conclusions encore plus contradictoires. L'addition d'oxalate au sang n'altère

pas la quantité de phosphore dosable d'après Barrenscheen, Doleschall et Popper [6]. Pour Lawaczeck [109], la défibrination amène des perturbations importantes, contrairement à Barrenscheen, Doleschall et Popper. Tolstoï [185] trouve chez l'homme le taux de phosphore inorganique très voisin, que ce soit dans le plasma du sang oxalaté ou dans le sérum séparé trois heures après coagulation du sang. Buell observe une concordance assez bonne chez le chien entre les chiffres obtenus avec le plasma du sang non traité par les anticoagulants et avec le plasma du sang citraté, concordance qui fait défaut quand il emploie l'oxalate. Gaebler [56] n'observe pas davantage cette concordance, soit qu'il emploie l'oxalate, le fluorure ou le citrate et il l'explique par l'action diluante des anticoagulants.

Blitstein [16] n'obtient de bons résultats pour le dosage du phosphore inorganique que sur le plasma du sang liquoïdé. Tous les autres anticoagulants, oxalate, fluorure, citrate, héparine et hirudine fausseraient les résultats pour des raisons différentes.

Il est à remarquer que le dosage du phosphore se fait très souvent par les méthodes colorimétriques de Benedict et Theis [13], de Fiske et Subarrow [48], etc... Certains auteurs pensent que l'action des anticoagulants ne permet qu'un dosage très relatif par ce procédé en raison de l'inhibition de la réaction colorée qu'ils entraînent. Pour certains autres, cette inhibition ne se produit qu'avec des doses d'anticoagulants salins de beaucoup supérieures à celle qu'on utilise couramment.

Généralement, *le dosage de calcium* se fait simultanément avec celui du phosphore pour déterminer le rapport calcium/phosphore qui joue un rôle important dans le rachitisme. Ce que nous avons dit à propos du phosphore peut être répété pour le calcium, d'autant plus que ce dernier cation paraît peu diffusible à travers la paroi globulaire. Haag et Jones [68] ont pratiqué des dosages de calcium et de phosphore sur le bétail. Ils recueillent le sang dans une solution saturée de citrate de soude. D'autres, comme Robinson et Huffman [161], prennent des précautions excessives pour ne pas provoquer

de stases veineuses, pour empêcher le départ de CO^2 en recueillant le sang sous huile de paraffine, tout cela pour éviter de modifier la répartition des ions, et ils ajoutent le citrate de lithium en poudre qui fausse les résultats beaucoup plus que ne pourrait le faire la stase veineuse ou la perte de CO^2.

MAGNÉSIUM. — Eveleth [45] a étudié la répartition du magnésium entre le plasma et les globules dans le sang citraté à 3 p. 1.000. Dans ces conditions, la perturbation apportée par l'anticoagulant est assez faible ; il trouve, d'une façon générale, que les cellules rouges sont plus riches en magnésium que le plasma, sauf chez les veaux non sevrés. Ces résultats sont d'accord avec ceux d'Abderhalden [1], de Greenberg et ses collaborateurs [64, 65], de Green et Maskill. Dans tous ces travaux, les auteurs ont travaillé sur le plasma rendu incoagulable par divers sels et évidemment, l'eau s'est déplacée des globules vers le plasma. Si le magnésium se trouve sous forme peu diffusible dans les cellules, il est clair que les chiffres obtenus sont trop bas pour le plasma et au contraire trop élevés pour les globules. Donc, en réalité, la différence doit être moins grande que celle qui est indiquée par les auteurs.

Greenberg, Lucia, MacKay et Tufts [65] trouvent pour le magnésium globulaire des valeurs plus fortes que les auteurs précités. Malheureusement, il est impossible de comparer leurs résultats avec ceux des autres, car ils n'indiquent pas la méthode de préparation du plasma sanguin. Greenberg et MacKay [64] donnent des chiffres sensiblement comparables pour le plasma et pour le sérum. Ils indiquent, de plus, que l'action de l'oxalate ne modifie pas les résultats, mais il ajoute celui-ci au sérum séparé du caillot, ce qui, dans ce cas, est de toute évidence. Travaillant aussi sur le plasma du sang oxalaté sans comparer les résultats obtenus avec ceux que pourrait donner du plasma non additionné d'anticoagulant, ils ne peuvent naturellement pas reconnaître l'action diluante de ce sel.

*
* *

Les quelques exemples que nous apportons indiquent que la question des anticoagulants n'a attiré que peu ou pas l'attention des travailleurs et que, par suite, les résultats obtenus sur le sang additionné de fortes doses salines doivent être accueillis avec circonspection.

Cependant, depuis quelques années ce problème commence à être de plus en plus étudié. L'apparition récente de nouveaux anticoagulants tels que l'héparine permet heureusement d'éviter les erreurs grossières qu'entraînent constamment les anticoagulants salins. Il est regrettable que cet excellent anticoagulant ne convienne pas pour certains dosages, notamment, comme l'indique Fischer, pour la séparation des différentes fractions protéidiques.

Conclusions.

1° Le plasma du sang additionné de divers anticoagulants en poudre, oxalate, citrate, fluorure, héparine, liquoïde, hirudine, présente une diminution de protéides par rapport au plasma obtenu par centrifugation du sang non traité.

2° Le sang humain et le sang de divers animaux : lapin, mouton, poule, répondent sensiblement de la même façon.

3° L'intensité de la diminution observée est en rapport avec la quantité de substance utilisée. Il existe de légères variations suivant l'espèce et dans une même espèce entre les individus.

4° Les anticoagulants en solution hypertonique agissent de même. L'héparine, anticoagulant très puissant, qui, utilisé à des doses très faibles en solution, n'amène pas une diminution appréciable des protéides plasmatiques.

5° Les autres constituants du sang tels que le glucose accusent aussi, dans le sang traité, une diminution du même ordre de grandeur que celle des protéides.

6° Cette diminution, sauf pour le liquoïde, ne se produit qu'en présence des globules rouges. Le taux des protéides du

plasma additionné d'anticoagulant après soustraction des globules, reste constant

Le plasma peut être remplacé par le sérum et les globules rouges par des levures, sans que les résultats changent.

7° Cette diminution des protéides observée dans le plasma du sang traité, n'est pas due à une précipitation des protéides par l'anticoagulant, sauf pour le liquoïde, mais à la dilution du plasma par l'eau venue des globules rouges.

8° C'est la concentration moléculaire qui régit la répartition d'eau entre les globules et le plasma. Quand on augmente la concentration moléculaire du plasma, l'eau se dirige des globules rouges vers le plasma et les protéides comme les autres constituants du plasma se trouvent dilués. Quand, au contraire, on diminue la concentration moléculaire du plasma, le phénomène inverse se produit, l'eau passe du plasma vers les globules et le plasma se concentre.

9° L'addition au sang d'un anticoagulant en poudre ou en solution hypertonique provoque la diminution du volume globulaire. Cette diminution est due au départ d'eau des globules.

10° La quantité de protéides dans un volume déterminé de sang reste constante quand on ajoute un anticoagulant en solution ou en poudre. Le volume plasmatique augmentant, on comprend qu'il y ait une diminution apparente des protéides quand on dose ceux-ci sur une quantité déterminée dans le plasma. Mais on peut ramener par des calculs les résultats à une exactitude assez satisfaisante, en tenant compte du volume globulaire et du taux apparent des protéides plasmatiques. Cela est aussi exact pour d'autres constituants sanguins peu diffusibles.

11° La finesse de la paroi globulaire facilite le phénomène d'osmose entre les globules rouges et le plasma additionné de diverses substances, et l'équilibre s'établit très rapidement, en quelques minutes au plus. Aussi les globules rouges jouent un rôle important dans le maintien de la concentration moléculaire du sang.

12° L'étude de la dilution des constituants plasmatiques après addition au sang de différentes substances, permet de

vérifier indirectement la perméabilité de la paroi globulaire aux différents ions ou aux diverses molécules.

13° La perméabilité globulaire est régie par la concentration en ions hydrogène. Elle croît avec l'acidification du milieu, passe par un minimum au voisinage de pH 8,3 et s'élève lentement en milieux plus alcalins. Certains corps tels que l'urée, traversent facilement la paroi globulaire indépendamment du pH du milieu.

14° Au point de vue pratique, il ressort qu'il y a lieu d'appliquer les règles suivantes au dosage des protéides :

a) Taux réel des protéides dans le plasma. — Il ne peut être déterminé que sur le plasma frais obtenu par centrifugation rapide d'un sang qui n'est additionné d'aucune substance ou avec une très légère erreur sur le plasma du sang additionné d'héparine en solution de 0,5 à 2,5 p. 100 à raison de 100 à 150 milligrammes par litre.

b) Taux des protéides plasmatiques dans le sang total. — Les dosages pratiqués sur le plasma du sang additionné d'anticoagulants en poudre ou en solution, ne peuvent être calculés que d'après le volume du sang total en raison de la dilution plasmatique produite par l'exosmose globulaire. Pour cela, il faut déterminer le volume globulaire. Quels que soient l'anticoagulant et la forme sous laquelle ce dernier a été utilisé, on trouve alors toujours pour un même sang, des valeurs très voisines.

15° Le taux total des protéides reste constant dans le sérum séparé du caillot de deux à vingt-quatre heures après la coagulation du sang.

16° Le sérum provenant du sang total est plus pauvre en protéides que le sérum obtenu par coagulation du plasma du même sang.

17° La diminution de la concentration en protéides du sérum par rapport au plasma reconnaît deux causes :

a) L'élimination de la fibrine.

b) La dilution du sérum par l'eau globulaire.

18° C'est le départ de l'acide carbonique du sang qui régit

le passage d'eau globulaire dans le milieu environnant au moment de la coagulation.

19° On peut doser la fibrine avec précision par différence entre le plasma séparé des globules par simple centrifugation et le sérum provenant de ce même plasma.

20° Les résultats des dosages faits soit sur les globules, soit sur le plasma provenant du sang additionné de fortes doses d'anticoagulants salins, doivent être accueillis avec beaucoup de circonspection. Le chapitre de la répartition de différents corps entre le plasma et les globules est à reviser.

BIBLIOGRAPHIE

[1] ABDERHALDEN (E.) *Zeitschr. physiol. Chem.*, **25**, 1898, p. 65.
[2] ARTHUS (M.) et PAGÈS (C.). *Arch. de Physiol.*, 1890, p. 739.
[3] ARTHUS (M.). *La coagulation du sang.* G. Carré et G. Naud, édit., Paris, 1897.
[4] ASHBY (W.). *Amer Journ. Physiol.*, **68**, 1924, p. 585 et 611.
[5] BARNETT (C. W.), JONES (R. B.) et COHN (R. B.). *Journ. Exp. Med.*, **55**, 1932, p. 683
[6] BARRENSCHEEN (H. K.), DOLESCHALL (F.) et POPPER (L.). *Biochem. Zeitschr.*, **177**, 1926, p. 39.
[7] BAYLISS (L. E.) et FEE (A. R.). *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 60
[8] BELLIS (C. J.) et SCOTT (F. H.). *Proc. Soc. Exer. Biol. and Med.*, **29**, 1932, p. 1105.
[9] BELLIS (C. J.) et SCOTT (F. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **111**, 1935, p. 17.
[10] BEHRING (E.). *Münch. med. Wochenschr.*, **58**, 1911, p. 655.
[11] BENEDICT (S. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 141.
[12] BENEDICT (S. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 161.
[13] BENEDICT (S. R.) et THEIS (R. C.). *Journ. Biol. Chem.*, **61**, 1924, p. 63.
[14] BERTRAND (G.). *C. R. du Lab. de Carlsberg. Sér. Chim.*, **22**, 1938, p. 67.
[15] BING (J.). *Acta Med. Scand.*, **86**, 1935, p. 367.
[16] BLITSTEIN (I.). *Revue Belge des Sciences Méd.*, **7**, 1935, p. 69.
[17] BLIX. *Biochem. Zeitschr.*, **74**, 1916, p. 302.
[18] BODANG (A.). *Arch. experim. Path. u. Pharmak.*, **52**, 1905, p. 242.
[19] BORCHART (W.). *Arch. f. Schiffs. und Trop. Hyg.*, **34**, 1930, p. 327.
[20] BORDET (J.) et GENGOU. *Annales de l'Institut Pasteur*, **15**, 1901, p. 129.
[21] BRODIN (P.), RICHET (C.) et SAINT-GIRONS (F.). *Journ. de Physiol. et de Path. Génér.*, **18**, 1919-20, p. 8.
[22] BRUGER (M.) et POINDEXTER (C. A.). *Journ. Biol. Chem.*, **101**, 1933, p. 21.
[23] BRULL (L.). *Arch. Intern. Physiol.*, **32**, 1930, p. 138.
[24] BUELL (M. V.). *Journ. Biol. Chem.*, **56**, 1923, p. 97.

[25] CAPPS. Cité d'après Ponder et Saslow.
[26] CHERBULIEZ (A.). *Ann. de Physiol. et de Physicochim. biol.*, **1**, 1925, p. 25.
[27] CHRISTENSEN (J.) et WARBURG (E. J.). *Acta med. Scand.*, **70**, 1929, p. 286.
[28] COLLIP (J.-B.). *Journ. Biol. Chem.*, **42**, 1920, p. 227.
[29] CONKLIN (R. E.). *Amer. Journ. Physiol.*, **95**, 1930, p. 79, 91 et 98.
[29 *bis*] CULBERTSON (J. T.) *Amer. Journ. Physiol.*, **107**, 1934, p. 120.
[30] CULLEN (G. F.) et VAN SLYKE (D. D.). *Journ. Biol. Chem.*, **41**, 1920, p. 587.
[31] CUTTING (W. C.) et CUTTER (R. D.). *Amer. Journ. Physiol.*, **113**, 1935, p. 150 et **114**, p. 204
[32] DAVIS (J. E.) et BREWER (N.). *Amer. Journ. Physiol.*, **113**, 1935, p. 586.
[33] DAVSON (H.) et PONDER (E.). *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 756.
[34] DAVSON (H.). *Journ. Cellular and Comp. Physiol.*, **10**, 1937, p. 247.
[35] DAVSON (H.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 676.
[36] DAVSON (H.). *Biochem. Journ.* **30**, 1936, p. 391.
[37] DELEZENNE. *C. R. Soc. Biol.*, 1896, p. 782; 1897, p. 462 et *Arch. de Physiol.*, 1897.
[38] DENIS (W.) et MEYSENBERG (L.). *Journ. Biol. Chem.*, **71**, 1926, p. 587.
[39] DRESEL (K.) et LEITNER (Z.). *Zeitschr. klin. Med.*, **3**, 1929, p. 394.
[40] DREYER (G.) et RAY (W.). *Journ. Path. and Bact.*, **13**, 1909, p. 344, et **17**, 1912, p. 143.
[41] EGE (R.). *Biochem. Zeitschr.*, **115**, 1921, p. 88; **130**, 1922, p. 99, et **134**, 1923, p. 234. *Biochem. Journ.*, **21**, 1927, p. 967. *Amer. Journ. Physiol.*, **72**, 1925, p. 76.
[42] EGE (R.). *Biochem. Zeitschr.*, **3**, 1920, p. 189.
[43] EGE (R.) et ROCHE (J.). *Skand. Arch. Physiol.*, **59**, 1930 p. 75.
[44] EISENMAN (A. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **71**, 1926, p. 587.
[45] EVELETH (D. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **119**, 1937, p. 289.
[46] FALTA et RICHTER-QUITTNER (M.). *Biochem. Zeitschr.*, **114**, 1921, p. 144.
[47] FELDMANN (T. N.) et ULANOVSLAJA. *Acta Med. Scand.*, **87**, 1935, p. 65.
[48] FISKE (C. H.) et SUBBAROW (Y.). *Journ. Biol. Chem.*, **66**, 1925, p. 375.
[49] FOLIN (O.). *Journ. Biol. Chem*, **77**, 1928, p. 421; **81**, 1929, p. 231; **83**, p. 115; **82**, p. 83; **86**, 1930, p. 173 et 179.
[50] FOLIN (O.) et BERGLUND (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 395.
[51] FOLIN (O.) et SVEDBERG (A.). *Journ. Biol. Chem.*, **70**, 1926, p. 421.
[52] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1927, p. 353. *C. R. Soc. Biol.*, **100**, 1929, p. 1196 et 1198.
[53] FOSTER (D. P.) et WHIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **58**, 1922, p. 365, 379 et 407.
[54] FREDERICIA (L. S.). *Journ. Biol. Chem.*, **42**, 1920, p. 245.
[55] FREUD. Cité d'après Gilbert et Weinberg.
[56] GAEBLER (O. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **99**, 1932, p. 99.
[57] GARDNER (J. A.), GAINSBOROUGH (H.) et MURRAY (R.). *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 1457.

[58] GELLHORN (E.) et RÉGNIER (J.). *La perméabilité en physiologie et en pathologie générale*. Masson, édit., Paris, 1936.
[59] GETTLER (A. O.) et BAKER (W.). *Journ. Biol. Chem.*, **25**, 1916, p. 211.
[60] GILBERT (A.) et WEINBERG (M.). *Traité du Sang*. Baillière et Fils, édit., Paris, 1910.
[61] GOUGH (A.). *Biochem. Journ.*, **18**, 1923, p. 202.
[62] GRAM (H. C.). *Journ. Biol. Chem.*, **44**, 1921, p. 297.
[63] GREEN. *Journ. of Physiol.*, **8**, 1888, p. 354.
[64] GREENBERG (D. M.) et MACKAY (M. A.). *Journ. Biol Chem.*, **96**, 1932, p. 419.
[65] GREENBERG (D. M.), LUCIA (S. P.), MACKAY (M. A.) et TUFTS (E. V.). *Journ. Biol. Chem* , **100**, 1933, p. 139.
[66] GUILLAUMIN (Ch. O.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, 1930, p. 491.
[67] GÜRBER. *Jahresber. Forschr. Thierchem.*, **25**, 1895, p. 165.
[68] HAAG (J. R.) et JONES (I. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **110**, **1935**, p. 439.
[69] HALDANE (J. S.) et PRIESTLEY (J. G.). *Journ of Physiol.*, **50**, **1916**, p 297.
[70] HALVERSON (J. O.), MOHLER (H. K.) et BERGEIM (O.). *Journ. Biol. Chem.*, **32**, 1917, p. 171.
[71] HAMBURGER (H. J.). *Arch. f. Physiol.*, 1893, Suppl., p. 153.
[72] HAMBURGER (H. J.). *Arch. Anat. u. Physiol.*, 1892, p. 513 et 1898, p 317.
[73] HAMBURGER (H. J.). *Biochem. Zeitschr.*, **86**, 1918, p. 309.
[74] HAMBURGER (H. J.) et BUBANOVIC. *Arch. Inter. Physiol.*, **1**, 1910, p. 10.
[75] HAMBURGER (H. J.). *Wien. Med. Wochenschr.*, **66**, 1916, p. 519 et 575.
[76] HAMMERSTEN (O.). *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **22**, 1876, p. 333 et *A. g. P.*, **14**, 1876, p. 211.
[77] HAMPSON et MAIZELS. *Journ. of Physiol.*, **62**, 1927-28, p. 16.
[78] HARRIS (D. T.). *Brit. Journ. Exper. Path.*, **1**, 1920, p. 142.
[79] HASTINGS (A. B.) et SENDROY (J.). *Journ. Biol. Chem.*, **76**, 1928, p. 565.
[80] HASTINGS (A B.) et VAN DYKE (H. B.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 13.
[81] HAYCRAFT (J. B.). *Arch. f. experim. Path. u. Pharmak.*, **18**, 1884, p. 209.
[82] HEILMEYER (L.). *Biochem. Zeitschr.*, **212**, 1929, p. 430.
[83] HENDERSON (L. J.). *Le Sang*. Edit. « Presses Universitaires », Paris, 1931.
[84] HEMINGWAY (A.), COLLINS (D. A.) et BERNHART (F.). *Amer. Journ. Physiol.*, **117**, 1936, p. 102.
[85] HOWE (P. E.). *Physiol. Rev.*, **5**, 1925, p. 439.
[86] HOWELL (W.). *Amer. Journ. Physiol.*, **63**, 1922-23, p. 434 et **71**, 1924-25, p. 553.
[87] HEWSON. Cité d'après le *Dictionnaire de Physiologie* de C. Richet. F. Alcan, édit., Paris, 1898.
[88] HÖBER (R.). *Journ. Cell. and Cop. Physiol.*, **7**, 1936, p. 367.

HÖGLER (F.) et THOMANN (A.). *Biochem. Zeitschr.*, **209**, 1929, p. 1.
[90] HOLMAN (L.), MAHONEY (E. B.) et WHIPPLE (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, **59**, 1934, p. 251.
[91] HOOPER (C. W.), SMITH (H. P.), BELT (A. E.) et WHIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **51**, 1920, p. 205.
[92] JACOBS (M. H.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **3**, 1933, p. 29.
[93] JACOBS (M. H.) et PARPART (A. K.). *Biol. Bull.*, **65**, 1933, 512.
[94] JACOBS (M. H.), GLASSMANN (H. N.) et PARPART (A. K.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.* **7**, 1935, p. 197.
[95] JACOBS (M. H.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **4**, 1934, p. 161.
[96] JACOBS (M. H.). *Biol. Bull.*, **67**, 1934, p. 325.
[97] JACOBS (M. H.) et PARPART (A. K.). *Biol. Bull.*, **63**, 1932, p. 224.
[98] JENKINS (C. E. A.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **13**, 1932, p. 127.
[99] JONES (T. B.) et SMITH (P. H.). *Amer. Physiol.*, **94**, 1930, p. 144.
[100] KEITH, ROWNTREE et GERAGHTY. *Arch. Inter. Med.*, **61**, 1916, p. 547.
[101] KERR. *Journ. Biol. Chem.*, **85**, 1929, p. 47.
[102] KERR (W. J.), HURWITZ (S. H.) et WIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **47**, 1918, p. 370.
[103] KLINGHOFFER (K. A.). *Amer. Journ. Physiol.*, **118**, 1937, p. 431.
[104] KÖPPE. *Pflüger Arch.*, **107**, 1905, p. 86.
[105] KREVISKY (C.). *Biochem. Journ.*, **24**, 1930, p. 815.
[106] KYLIN (E.). *Acta Med. Scand.*, **83**, 1934, p. 347.
[107] KYLIN (E.) et KRISTENSON. *Acta Med. Scand.*, **83**, 1934, p. 273.
[108] KYLIN (E.). *Acta Med. Scand.*, **84**, 1934, p. 73.
[109] LAWACZECK (H.). *Biochem. Zeitschr.*, **145**, 1924, p. 351.
[110] LEENDERTZ et GROMELSKY. Cité d'après Starlinger.
[111] LEHMAN (W.) et SCOTT (F. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **111**, 1935, p. 43.
[112] LEICHSERING (J. M.), BIESTER (A.), HÖNIG (H. H.), FURNAS (S. M.), FOSS (E. S.) et ROUTT (M. V.). *Amer. Journ. Physiol.*, **99**, 1932, p. 391.
[113] LEMELAND (J.) et DELETANG (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 1934, p. 1518.
[114] LESTER. Cité d'après Starlinger.
[115] LEVY (M.), MIGNON (S.) et HAFFNER (B.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1938, p. 145 et 305.
[116] LILIENFELD. Cité d'après Gilbert et Weinberg.
[117] LIMBECK. *Arch. f. exper. Path.*, **35**, 1894, p. 309.
[118] LINDER (G. C.), LUNDSGAARD (C.) et VAN SLYKE (D. D.). *Journ. Exper. Med.*, **39**, 1924, p. 887.
[119] LINZENMEIER. *Pflüger Arch. f. d. ges. Physiol.*, **186**, 1921, p. 272.
[120] LUMIÈRE (A.) et COUTURIER (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **94**, 1926, p. 1166.
[121] MACKAY (E. M.). *Journ. Biol. Chem.*, **97**, 1932, p. 685.
[122] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **77**, 1933, p. 181.
[123] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **86**, 1936, p. 147.
[124] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Amer. Journ. Physiol.*, **111**, 1935, p. 655.
[125] MAC LEAN et MAC LEAN. Cité d'après Man et Guildea.
[126] MADDEN (S. C.), GEORGE (W. E.), WARAICH (G. S.) et WHIPPLE (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, **65**, 1937, p. 279 et 437 ; **67**, 1938, p. 675.
[127] MAIZELS (M.). *Biochem. Journ.*, **29**, 1935, p. 1970.
[128] MAIZELS (M.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 337.

[129] Maizels (M.). *Biochem. Journ.*, **27**, 1933, p. 33.
[130] Man (E. R.) et Guildea (E. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **99**, 1933, p. 43.
[131] Martens (R.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **10**, 1928, p 1336
[132] Marx (H.) et Mohr (W.). *Arch. Exper. Path. Pharmak.*, **156**, 1930, p. 105.
[133] Mathews. Physiol. Chemistry. W. Woodland C°, édit., New-York, 1925.
[134] Millar. *Quart. Journ. Exp. Physiol.*, **15**, 1929, p. 187.
[135] Moore (B.) et Roaf (H. F.). *Biochem. Journ.*, **3**, 1907, p. 55.
[136] Moore (N. S.) et Van Slyke (D D.). *Journ. Clin. Invest.*, **8**, 1930, p. 337.
[137] Mond (R.). *Pflüger Arch.*, **217**, 1927, p. 618 ; **219**, 1928, p. 467 ; **226**, 1935, p. 153, et *Arch. Ges. Physiol.*, **217**, 1927, p. 618.
[138] Neuhausen (B. S.) et Breslin (J.-E.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **34**, 1923, p. 199.
[139] Neuwith. *Journ. Biol. Chem.*, **117**, 1936, p. 335.
[140] Nygaard (K.-K.), Wilder (M.) et Berkson (J.). *Amer. Journ. Physiol.*, **114**, 1935, p. 128.
[141] Olmsted (J. M. D.). *Amer. Journ. Physiol.*, **111**, 1935, p. 551 et **114**, 1936, p. 488.
[142] Parpart (A. K.) et Schull (J. C.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **6**, 1935, p. 137.
[143] Peters (J. P.), Eisenman (A. J.) et Bulger (H. A.). *Journ. Clin. Invest.*, **1**, 1925, p. 435.
[144] Pfeiffer et Koster. Cités d'après Starlinger.
[145] Pickering (J. W.). *The blood plasma in health and disease.* Mac Millian C°, Edit., New-York, 1929.
[146] Pommerenke (W. T.), Slavin (H. B.), Kariher (D. H.) et Whipple (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, 1935, p. 261 et 383.
[147] Ponder (E.). *Journ. of Physiol.*, **83**, 1935, p. 34.
[148] Ponder (E.). *Journ. of Physiol.*, **85**, 1935, p. 439.
[149] Ponder (E.) et Robinson (E. J.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 1940, et *Journ. of Physiol.*, **83**, 1935, p. 352.
[150] Ponder (E.) et Saslow. *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 18 et 169 et **73**, 1931, p. 267.
[151] Ponder (E.) et Saslow (G.). *Quart. Journ. Exper. Physiol.*, **19**, 1929, p. 319.
[152] Porgès et Spiro. Cités d'après Starlinger.
[153] Powers (J. H.), Bowie (M. A.) et Howard (J. M.). *Amer. Journ. Physiol.*, **92**, 1930, p. 665.
[154] Power (M. H.) et Peterson (R.). *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **28**, 1931, p. 548.
[155] Priestley (J. G.). *Journ. of Physiol.*, **50**, 1916, p. 304 et **55**, 1921, p. 305.
[156] Raszeja (S.) et Slavinsky (M. A.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 1933, p. 1569 et **16**, 1934, p. 1692.
[157] Reiche (F.). et Fretwurst (F.). *Beitr. klin. Tuberkulose* **72**, 1929, p. 484.
[158] Richter-Quittner. *Biochem. Zeitschr.*, **95**, 1919, p. 179.
[159] Ringer (S.) et Sainsbury (H.) *Journ. of Physiol.*, **11**, 1890, p. 369.
[160] Rioch (D.). *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 45.

[161] ROBINSON (C. S.) et HUFFMAN (C. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **67**, 1926, p. 245.

[162] ROSENBERG (H.), SEIFFERT (R. W.), KALENSCHER (H.) et WITTHOLZ. *Arch. Wissenschaftl. u. Prakt. Tierheilk.*, **60**, 1929, p. 489.

[163] ROSSDALE (G.). *Quart. Journ. Med.*, **16**, 1922, p. 245.

[164] SAINT-RAT (L.) et RONFAUT (J.). *Bull. Sciences Pharmacol.*, **27**, 1920, p. 289.

[165] SCHIÖDT (E.). *Biochem. Journ.*, **25**, 1931, p. 8.

[166] SCHMIDT (A.). Zur Blutlehre, 1892, et Weitere Beiträge zur Blutlehre, 1895.

[167] SCHMIDT (L. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **109**, 1935, p. 449.

[168] SCHMIDT (A. A.) et TULJTSCHINSKAJA (K.). *Zeitschr. Ges. exp. Med.*, **90**, 1933, p. 150.

[169] SCHULTZ (E. W.), NICHOLES (J. K.) et SCHAEFFER (J. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **1**, 1925, p. 101.

[170] SCHÜRER (J.). *Arch. exper. Path. u. Pharmak.*, **66**, 1911, p. 171.

[171] SCOTT (F. H.). *Journ. of Physiol.*, **50**, 1916, p. 128.

[172] SLAVINSKY (A.). *Biochem. Journ.*, **27**, 1933, p. 356.

[173] SMIRK (F. H.). *Journ. Physiol.*, **75**, 1932, p. 81 ; *Journ. Exper. Path.*, **9**, 1928, p. 81 ; *Biochem. Journ.*, **21**, 1927, p. 31 et 36 et **22**, 1928, p. 739.

[174] SMITH (H. P.). *Amer. Journ. Physiol.*, **51**, 1920, p. 221.

[175] SNAPPER (J.). *Proc. Roy. Soc. Med.*, **24**, 1931, p. 1371.

[176] SOMOGYI (M.). *Journ. Biol. Chem.*, **90**, 1931, p. 731 et **78**, 1928, p. 117.

[177] SOMOGYI (M.). *Journ. Biol. Chem.*, **103**, 1933, p. 665.

[178] SPANNUTH (J. R.) et POWER (M. H.). *Journ. Biol. Chem.*, 93, 1931, p. 343.

[179] SPERRY (W. M.) et SCHOENHEIMER. *Journ. Biol. Chem.*, **110**, 1935, p. 655.

[180] STARLINGER (W.). *Biochem. Zeitschr.*, **140**, 1923, p. 203 et **143**, p. 179.

[181] STRÖM (J.). *Acta Med. Scand.*, **96**, 1938, p. 365.

[182] SWANSON (P. P.) et SMITH (A. H.). *Journ. Biol. Chem.*, 97, 1932, p. 745.

[183] SWEDIN (B.). *Biochem. Zeitschr.*, **257**, 1933, p. 411.

[184] TODD (C.) et WHITE (R. G.) et ASHBY. *Proc. Roy. Soc.*, **84**, 1912, p. 255.

[185] TOLSTOÏ (E.). *Journ. Biol. Chem.*, **55**, 1923, p. 157.

[186] TOMPSETT (S. L.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 1544.

[187] TREMBLE (H. C.) et MADDOCK (S. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **78**, 1928, p. 323.

[188] VAN SLYKE (D. D.) et CULLEN (G. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **30**, 1917, p. 289.

[189] VAN SLYKE (D. D.), WU (H.) et MAC LEAN. *Journ. Biol. Chem.*, **56**, 1923, p. 765.

[190] VARS (H. M.). *Amer. Journ. Physiol.*, **93**, 1930, p. 554.

[191] WAKEMAN, EISENMAN (A. J.) et PETERS (J. P.). *Journ. Biol. Chem.*, **73**, 1927, p. 567.

[192] WALKER (A.). *Journ. Biol. Chem.*, **101**, 1933, p. 269.

[193] WANG (C. C.) et FELSHER (A. R.). *Journ. Lab. and Clin. Med.*, **10**, 1925, p. 269.
[194] WARBURG (E. J.). *Biochem. Journ.*, **16**, 1922, p. 153.
[195] WEECH (H. A.), REEVERS (E. B.) et GOETTSCH (E.). *Journ. Biol. Chem.*, **113**, 1936, p. 167.
[196] WESTERGREN (A.), JUHLIN-DAUNFELT (C.) et SCHNELL (R.). *Acta Méd Scand.* **50**, 1930, p. 307.
[197] WILANDER (O.). *Acta Med. Scand.*, **94**, 1938, p. 258
[198] WU (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 33.
[199] WU (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 21.

RECHERCHES SUR QUELQUES BASES SYNTHÉTIQUES ANTAGONISTES DE L'HISTAMINE

par ANNE-MARIE STAUB.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de chimie thérapeutique.*)

PREMIÈRE PARTIE

Depuis les premiers travaux de Dale et ses collaborateurs sur la β imidazoléthylamine parus en 1910, l'attention de bien des savants a été attirée par la multiplicité des actions de ce produit dans l'organisme ; de nombreux chercheurs de toutes langues s'attachèrent au nouveau problème et le nom d'histamine donné à ce corps par les physiologistes, quelques années plus tard, prit immédiatement droit de cité dans la littérature scientifique. Ne pouvant citer les travaux relatifs à la physiologie de l'histamine, nous nous bornerons à résumer quelques résultats devenus classiques aujourd'hui : la contraction de tous les muscles lisses isolés ou *in situ*, particulièrement marquée sur l'intestin et l'utérus de cobaye ainsi que sur les bronches du même animal ; l'hypersécrétion de toutes les glandes : salivaires, gastriques, pancréatiques, intestinales, surrénales — ainsi qu'une augmentation du volume de la bile ; l'action vasomotrice très variable suivant les espèces considérées et les conditions d'expérience, mais décelable le plus souvent par une vasoconstriction profonde et une vasodilatation périphérique ; la modification de la formule sanguine ; l'action cardiaque, responsable, pour certains auteurs, du choc hypotenseur. Enfin, ne devrait-on pas parler encore d'une action sur le système nerveux central, d'après les conclusions des toutes récentes expériences de Cornil et Malmejac [20]? Ces auteurs ont, en effet, mis en évidence l'inaction de l'histamine sur la sécrétion salivaire sous-maxillaire du chien curarisé lorsqu'on

a préalablement lié la carotide interne correspondante. Ils montrent ainsi la nécessité du passage du poison sur les centres nerveux pour obtenir la sécrétion histaminique classique.

Parallèlement, de nombreux travaux mettaient en évidence dans presque tous les tissus de l'organisme la présence d'histamine, ou tout au moins d'une substance présentant les caractères physiologiques de l'histamine, dite « substance histaminique ». En 1930, Feldberg et Schilf n'hésitent pas, dans l'introduction de leur remarquable monographie : « Histamin seine Pharmakologie und Bedeutung für die Humoralphysiologie » [31], à présenter l'histamine comme une « hormone tissulaire » (Gewebshormone). Le mot hormone, pris ici dans le sens donné par Starling [74], définit : « toute substance qui se forme dans les conditions normales au sein des cellules de chaque tissu de l'animal, puis est transportée par le courant sanguin aux organes éloignés. L'adjectif « tissulaire » ajouté par les auteurs allemands oppose l'hormone en question aux sécrétions internes issues de cellules spécialement différenciées.

La mise au point par Barsoum et Gaddum [6], en 1935, d'une méthode permettant l'isolement de la substance histaminique dans les humeurs, modifiée récemment par Code [17], qui identifia en outre chimiquement cette substance à l'histamine [18], fut l'origine de toute une floraison de travaux : Barsoum et ses collaborateurs en Égypte, Marcou et son école en Roumanie, Cerqua en Italie, Loeper, ainsi que Ungar et ses collaborateurs, en France, dosèrent l'histamine dans le sang humain ou animal dans une infinité de cas, pathologiques ou non.

Dans le domaine physiologique, on a été ainsi amené à attribuer un rôle à l'histamine dans la fatigue musculaire et on l'a même considérée comme médiateur chimique au niveau des synapses neuro-musculaires (Ungar [81], Gajdos [38]).

Dans le domaine pathologique, on compte aujourd'hui tant de phénomènes à l'actif de l'histamine que ce nombre finit par laisser un peu sceptique. Son rôle a été tour à tour invoqué dans l'anaphylaxie, les états allergiques, l'intoxication générale consécutive à l'ypérite ou aux brûlures graves, ainsi que dans les suites de l'obstruction intestinale. On arrive à se

demander, dans certains cas, si sa présence n'est pas plutôt la conséquence que la cause des troubles observés.

Devant une telle activité, on comprend que les physiologistes aient été bien souvent tentés de rechercher des produits capables de s'opposer aux effets de ce poison dans l'organisme. Rappelons brièvement les principaux résultats positifs obtenus dans cette voie.

Sur le choc histaminique expérimental du cobaye, Dale et Laidlaw [23] signalent déjà en 1910 l'action protectrice de l'atropine, résultat confirmé par la Barre [5] de nombreuses années plus tard.

Des travaux de Keeton, Luckardt et Koch [44], Leé et Kim [49], il ressort que l'atropine peut empêcher l'action hypersécrétrice des faibles doses de l'histamine sur les glandes gastriques, n'agissant pas, au contraire, sur les fortes doses; ce qui expliquerait les résultats négatifs obtenus par de nombreux auteurs : Popielski, Nathanson, Koskowski, etc.

Popielski [64] note que la scopolamine agit sur cette même sécrétion gastrique ; enfin, Fierens et Nayer [34] remarquent que l'absorption des graisses diminue aussi la réponse à l'histamine.

Sur le pancréas, Dale et Laidlaw [24] remarquent l'action de l'atropine, Molinari-Tosatti [60] montre qu'après ligature du pylore l'antagonisme est total.

Nombreux ont été les essais pour prévenir la contraction des muscles lisses provoquée par l'histamine. Sur l'intestin, tandis que Dale et Laidlaw [23], puis Yamauchi [92] nient l'action de l'atropine, Vanysek [86] observe son antagonisme avec de très grosses doses, Feldberg [30] obtient le même résultat avec des doses faibles. Guggenheim et Löffler [39] n'obtiennent plus de réponse à l'histamine après indoléthylamine. Guillot et Ong Siam Gwan [40] notent l'action de quelques substances capillaroactives. Reschad [65] empêche la contraction histaminique de se produire par barbotage de CO_2 dans le bain.

D'après Sugimoto [75], l'utérus contracté par l'histamine est relâché par l'adrénaline.

Les nombreux travaux (Bach et Pick, Koessler et Lewis, Dale et Laidlaw, etc.) concernant la protection des bronches

par l'atropine contre l'histamine ont mis en évidence l'action plus forte de cet alcaloïde sur les bronches perfusées que sur l'animal vivant et la sensibilité particulière du cobaye. Pal [63] montre, d'autre part, que les poumons d'un cobaye, contractés après une injection d'histamine au point de ne pouvoir se laisser distendre par la respiration artificielle, reprennent leur élasticité après une injection intraveineuse de caféine. Pour Weber [89], la nitroglycérine produit le même effet. L'action du cardiazol a été mise en évidence, dans ce même cas, par Szakàll [76]

D'après les travaux de Spor [73], de Mogena et Fernandez [59], l'adrénaline et l'histamine injectées simultanément dans la peau préviendraient l'apparition de la triple réaction de Lewis. On sait que cette triple réaction consiste dans l'apparition successive des trois manifestations suivantes :

1° Une coloration rouge foncé au lieu d'injection, environ vingt secondes après la piqûre (rougeur locale) ;

2° Quelques secondes plus tard, une rougeur plus diffuse de la peau (tache rouge ou rougeur périphérique, ou érythème-réflexe) ;

3° Une ou deux minutes plus tard, une papule blanche à l'emplacement de la rougeur locale primitive.

Moins catégoriques, Sollmann et Pilcher [70], ainsi que Lamson, ne notent que la disparition de la rougeur périphérique. L'action antagoniste de l'adrénaline a été signalée sur les vaisseaux du foie par Dale et ses collaborateurs [22], sur les coronaires par Hashimoto [43]. Son rôle sur la pression a été mis en évidence par Fuji [36]. Cet auteur a pu constater l'effet hypertenseur de l'histamine sur le lapin après ligature des veines surrénales, puis l'inversion de cette hypertension après une lente injection d'adrénaline dans les mêmes conditions physiologiques. Par contre, Feldberg [32] n'observe après injection d'adrénaline aucune inversion de l'hypertension histaminique du lapin profondément endormi à l'éther.

Sur le cœur et les coronaires du cobaye et du lapin, Viotti [87] note l'action antagoniste de l'atropine, Szakàll [76] celle du cardiazol.

Signalons enfin la protection obtenue par Dicker [27] avec le nitrite d'amyle sur la vasoconstriction rénale.

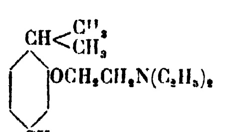
On voit que, si la littérature est riche sur cette question d'antagonisme, il nous est impossible, en établissant le bilan des résultats, de trouver un produit capable de s'opposer à un ensemble de manifestations de l'histamine, exception faite pour l'atropine, qui agit à la fois sur l'intestin, les bronches, les sécrétions, le cœur et le choc histaminique du cobaye. De plus, aucune étude systématique n'a jamais été entreprise avec une série de produits chimiquement définis comme il a été fait maintes fois pour les antagonistes de l'adrénaline ou de l'acétylcholine.

Cette étude nous a semblé présenter un intérêt assez grand pour mériter d'être abordée : tel est le but de ce travail.

*
* *

A quelle série chimique allions-nous nous adresser ?

Nous avions à notre disposition un certain nombre de produits synthétisés dans le laboratoire de M. Fourneau en vue d'une action sympatholytique ou sympathomimétique. Recherchant si parmi eux il ne s'en trouverait pas qui possédassent quelque activité antihistaminique, nous avons essayé successivement : des quinoxyéthylamines, des naphtoxyéthylamines, des dioxans, dont l'activité remarquablement sympatholytique a été signalée pour la première fois par D. Bovet et P. Maderni [12], des phénoxyéthylamines. C'est dans cette dernière série, étudiée largement dans le domaine sympatholytique par J. Lévy [52] que nous avons trouvé un produit manifestant un antagonisme très net vis-à-vis de l'histamine : la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F).



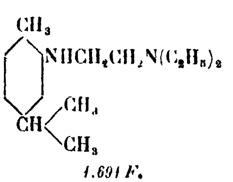
929 F.

Ce n'est pas la première fois qu'une activité physiologique est reconnue à ce produit. En 1929, Anan [2] notait son effet sympatholytique sur l'utérus et l'intestin du lapin, sous le

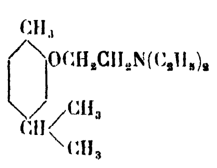
nom de thymoxyéthyldiéthylamine. Depuis, plusieurs travaux japonais ont signalé son action sur l'hypoglycémie (Asakura [4]) et l'hypertension (Maeda [55]) adrénaliniques. En France, si Bovet et Maderni [12] n'obtiennent avec le 929 F qu'une très faible action sur l'hypertension, ils observent aussi l'inversion de l'action inhibitrice intestinale de l'adrénaline.

Ayant donc constaté l'activité antihistaminique du 929 F, nous nous sommes demandé comment pourraient jouer sur cette activité les modifications apportées soit à la chaîne, soit au noyau benzénique : d'où l'étude des mono- et diméthylphénoxyéthylamines.

Nous en étions là de nos recherches lorsque nous eûmes entre les mains quelques éthylènediamines préparées par Mme de Lestrange et J.-P. Fourneau. Aucune des bases signalées comme sympathicomimétiques par ces chimistes et D. Bovet [13] ne possède une action antihistaminique Par contre, nous avons pu retrouver toute l'action du 929 F avec la N(2)méthyl(5)isopropylphényl N'diéthyléthylènediamine (1691 F), dont la structure chimique rappelle parfaitement celle du 1379 F isomère du 929 F et aussi actif que lui.

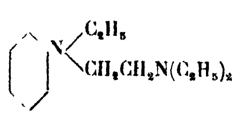


1.691 F.



1.379 F.

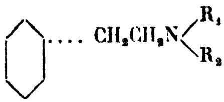
Enfin, cette série des éthylènediamines nous a livré un produit plus actif que tous ceux déjà nommés : c'est la Nphényl-NéthylN'diéthyléthylènediamine (1571 F).



1.571 F.

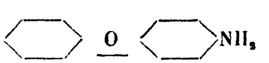
Nous avons recherché l'influence que les modifications apportées au noyau des phénoxyéthylamines exerceraient sur le noyau correspondant des phényléthylènediamines.

Nos essais mettent ainsi en lumière, une fois de plus, avec quelle facilité des modifications relativement faibles dans leur structure chimique peuvent transformer les caractères pharmacodynamiques des bases synthétiques.



L'on savait déjà combien facilement un changement des radicaux fixés sur l'amine, le simple déplacement d'une fonction phénolique ou l'introduction d'un pont oxygéné entre le noyau benzénique et la chaîne latérale était susceptible de correspondre à des propriétés pharmacologiques différentes, voire opposées : sympathomimétiques, sympatholytiques, nicotiniques, parasympathomimétiques.

Nos recherches font d'autre part ressortir la parenté qui, dans certains cas, existe entre les phénoxyéthylamines et les Nphényléthylènediamines correspondantes. Rappelons que, dans un tout autre domaine, Erlenmayer et Berger [29] ont pu montrer que les dérivés suivants I et II :





faisaient l'un et l'autre apparaître dans l'organisme des immun-sérums identiques : fait remarquable si l'on songe à la grande spécificité des réactions immunologiques.

Notre travail se divisera en 6 chapitres :

Le premier rapportera les résultats obtenus avec les différents produits sur un même test physiologique : la protection du cobaye contre le choc histaminique.

Dans les chapitres II, III et IV, nous dirons successivement à quelles manifestations physiologiques de l'histamine peut s'étendre l'antagonisme constaté, puis si cette action est bien spécifiquement antihistaminique ; enfin, nous émettrons quelques idées sur le mode d'action des antihistaminiques dans l'organisme

Devant l'activité particulière présentée au cours de cette

étude par la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F) et la NphénylNéthylN'diéthyléthylènediamine (1571 F), il nous a semblé intéressant de consacrer la cinquième partie de ce travail à une brève étude pharmacologique de ces deux corps et de rapporter, dans un dernier chapitre, les premiers résultats obtenus avec le 929 F dans deux phénomènes imputables en grande partie à l'histamine : le choc anaphylactique expérimental du cobaye et l'intoxication expérimentale du même animal à l'ypérite.

I

RECHERCHES SUR L'ACTION ANTIHISTAMINIQUE DE SUBSTANCES NOUVELLES

A. — Recherche d'un test.

Au moment de rechercher un produit actif contre l'histamine, une question primordiale s'est posée à nous. Sur quelle manifestation physiologique de cette amine allions-nous essayer l'action antagoniste de nos produits ? Nous avons déjà exposé la multiplicité des actions de l'histamine dans l'organisme. Laquelle de ces actions était assez constante pour servir de test dans la comparaison de plusieurs produits ? Deux d'entre elles ont retenu notre attention :

1° La contraction provoquée sur une anse intestinale isolée de cobaye, par addition d'histamine dans le bain où elle plonge : nos premiers résultats furent obtenus par cette méthode.

2° Le choc histaminique expérimental du cobaye : c'est, à présent, le test que nous préférons pour l'étude de nos antihistaminiques.

Nous allons exposer successivement l'une et l'autre méthode et signaler les raisons qui nous ont amenée à adopter définitivement la seconde.

1° Intestin isolé du cobaye. — Mise en évidence par Dale et Laidlaw [23], Guggenheim et Löffler [39], Feldberg et ses collaborateurs [33], l'action de l'histamine sur l'anse intesti-

nale isolée de cobaye est aujourd'hui couramment utilisée pour le dosage biologique depuis la publication de Barsoum et Gaddum relative à ce sujet.

L'anse intestinale est prélevée sur la partie terminale de l'intestin grêle d'un cobaye préalablement saigné par section des carotides Elle est aussitôt plongée dans une solution de Tyrode non glucosé, dont la composition a été fixée par Webster [90] (NaCl, 9 grammes ; $CaCl_2$, 0 gr. 2 ; KCl, 0 gr. 2 ; $MgCl_2$, 0 gr. 1 ; eau, q. s. pour 1 litre) aux environs de 38°. Un fragment long de 2 à 3 centimètres est alors prélevé et suspendu à un stylet inscripteur dans un bain d'une solution de Tyrode-Webster de 100 cent. cubes convenablement aéré et maintenu à 38°.

Dans de telles conditions, l'addition de 1 γ d'histamine (0 milligr. 001) provoque toujours une réaction de l'intestin (1). Sur certains intestins très sensibles, on obtient même une réponse à 0,1 γ. La contraction, minime avec ces faibles doses, devient très forte si l'on ajoute 10 γ au bain : c'est cette dose que nous avons choisie pour l'essai de nos produits.

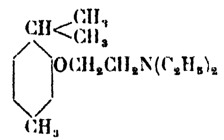
En pratique, on attend environ dix minutes après la suspension de l'anse intestinale au stylet inscripteur, puis on ajoute au bain 10 γ d'histamine (1 cent. cube d'une solution au 1/100.000) ; après lavage, on recommence jusqu'à obtention de deux contractions consécutives identiques. Si cela ne se réalise pas, l'intestin est éliminé.

On ajoute alors au bain 1 cent. cube de la solution du produit à étudier, puis 10 γ d'histamine. Si l'action de l'histamine est diminuée, on essaye après lavage 10 γ d'histamine dans un bain de solution de Tyrode-Webster pure pour vérifier la constance de la réponse ; on augmente dans les mêmes conditions d'expérience la concentration de la solution du produit en essai jusqu'à obtention de la suppression totale de l'effet histaminique.

Une telle méthode nous a permis de remarquer la très grande activité de la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F), qui supprime presque toujours l'action de

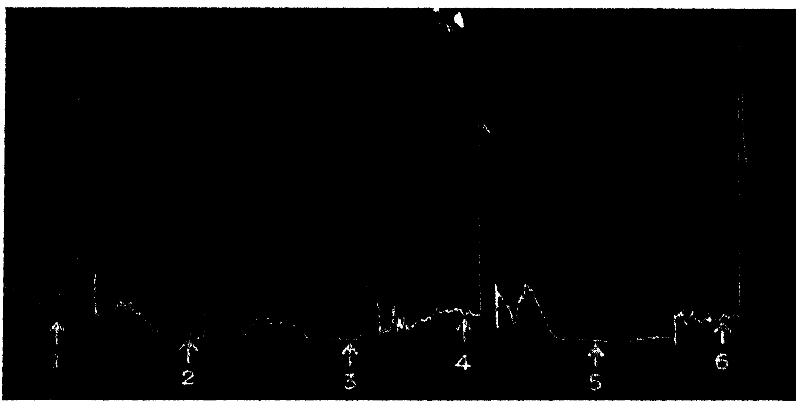
(1) Sauf indication contraire les doses de produit indiquées dans les expériences effectuées, suivant la technique de Dale, se rapportent à la quantité totale de substance ajoutée à un bain de 100 cent. cubes.

10 γ d'histamine par addition de 1 cent. cube d'une solution au 1/10.000, soit 0 milligr. 1 de 929 F, alors que tous les autres produits essayés [phénoxyéthyldiéthylamine, naphtoxy-



929 F.

éthyldiéthylamine, dioxans (2), quinoléines] n'agissaient qu'aux doses supérieures à 1 milligramme.



Graphique I. — Intestin de cobaye isolé, bain de 100 cent. cubes. En 1, 4, 6, addition de 0 milligr. 01 d'histamine dans une solution de Tyrode-Webster pure. En 2, addition de 0 milligr. 01 d'histamine après 0 milligr. 01 de 929 F. En 3, addition de 0 milligr. 01 d'histamine après 0 milligr. 05 de 929 F En 5, addition de 0 milligr. 01 d'histamine après 0 milligr. 1 de 929 F.

On remarquera sur la figure que la dernière contraction provoquée par l'histamine est égale à la première ; ceci oppose nos résultats à ceux obtenus par Guillot et Ong Siam [40] avec quelques substances capillaro-actives. Ces auteurs décrivent une action inhibitrice de ces produits (alcools, sels biliaires) vis-à-vis de l'histamine, pour de fortes concentrations (100 milligrammes et 1 gramme pour 100 cent cubes). Cette inhibition persiste après lavage et il arrive souvent qu'on ne retrouve

(2) Les bons résultats obtenus par Ungar, Parrot et Bovet [84] avec le 933 F s'expliquent par le fait que ces auteurs travaillent avec des doses beaucoup plus faibles d'histamine (1 γ).

jamais l'action primitive de l'histamine. Des concentrations plus faibles sont sans effet.

2° TOXICITÉ (COBAYE). — Plusieurs inconvénients nous ont obligée à abandonner ce mode de classification. Tout d'abord, lorsqu'on atteint les concentrations annulant l'effet de 10 γ d'histamine sur l'intestin, celui-ci ne répond pas toujours après lavage comme avant l'essai : si la contraction musculaire garde la même intensité, elle se laisse plus facilement diminuer ou supprimer dans les essais suivants. On ne peut donc attribuer aux derniers essais effectués sur un intestin la même valeur qu'aux premiers. D'autre part, les concentrations actives varient d'un intestin à l'autre. Avec le 929 F, par exemple, si 0 milligr. 1 suffit généralement pour annuler l'effet de 10 γ d'histamine, il faut parfois augmenter la dose jusqu'à 0 milligr. 5, voire 1 milligramme pour obtenir le même effet. Nous avons alors pensé mesurer l'action antihistaminique de nos produits d'après la protection obtenue chez le cobaye, contre une dose d'histamine mortelle pour des animaux témoins.

On sait que le cobaye est l'animal le plus sensible à l'histamine. La dose mortelle (inoculation intraveineuse) indiquée par Leschke [50] est de 0 milligr. 1 pour des cobayes de 230 à 300 grammes. Les mêmes résultats sont donnés par Schmidt et Stähelin [67]. Ces doses correspondent donc à 0,3-0 milligr. 4 par kilogramme.

Dale et Laidlaw [23] constatent qu'une injection de 0 milligr. 5 pour des cobayes pesant 800-1.000 grammes est toujours mortelle.

La Barre [5], enfin, donne 0 milligr. 35 comme dose généralement mortelle pour des cobayes de 500 grammes.

Dans nos très nombreux essais, nous avons été à même de confirmer ces données. Nous avons employé des cobayes pesant de 300 grammes à 600 grammes. Nous avons pu alors constater que, dans une série provenant du même élevage, la dose minima mortelle est remarquablement constante : en général, 0 milligr. 5 par kilogramme. Nous avons pourtant rencontré quelques séries d'animaux moins sensibles pour qui la dose minima mortelle s'élevait jusqu'à 1 milligramme par kilo-

gramme, ce qui dépasserait encore les chiffres donnés par la Barre. Rappelons les symptômes classiques : l'animal présente un choc en tout comparable au choc anaphylactique : bonds, arrêts respiratoires, hypothermie ; il tombe rapidement dans le coma et reste couché sur le côté, inerte, jusqu'à la mort, qui survient généralement en l'espace de trois à quatre minutes.

a) *Introduction du produit par voie sous-cutanée.* — Nous avons tout d'abord effectué la protection par l'injection sous-cutanée du produit. Vingt minutes avant l'injection intraveineuse d'histamine, nous injections sous la peau 40 milligrammes par kilogramme du produit, cette dose donnant de bons résultats avec le 929 F, produit le plus actif dans la série des phénoxyéthylamines.

Les animaux font presque toujours un choc, parfois très violent ; ils peuvent même tomber dans le coma, mais peu à peu la respiration reprend un rythme normal et l'on assiste à une véritable résurrection.

La classification des produits reposait sur la proportion des survivants chez les animaux ainsi traités. Par cette méthode s'affirme de nouveau la supériorité de la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F), qui nous donna 80 p. 100 de survies dans les conditions ci-dessus indiquées. Voici le protocole d'une expérience :

TABLEAU I.

NUMÉROS	POIDS en grammes	929 F en milligrammes par kilogramme	HISTAMINE en milligramme par kilogramme	OBSERVATIONS
		Témoins :		
78/43. . .	610		0,5	Mort en 2 minutes.
41	520		0,5	Mort en 3 minutes.
77/43. . .	690		0,5	Mort en 2 minutes.
		Protégés :		
66	660	40	0,5	Troubles, 10 minutes survie.
64	640	40	0,5	Aucun trouble, survie.
17	560	40	0,5	Troubles, 15 minutes survie.
76	610	40	0,5	Troubles, 10 minutes survie.
45	450	40	0,5	Mort en 6 minutes.

Tous les animaux survivants ont reçu, deux à sept jours plus tard, la dose mortelle d'histamine (0 milligr. 5 par kilogramme) : tous sont morts.

Malheureusement, cette méthode, comme toutes celles se basant sur des statistiques, demandait un très grand nombre d'expériences. Aussi avons-nous pensé à la modifier ; c'est ce qui nous amena à la technique définitivement adoptée dorénavant dans l'étude des produits essayés.

b) *Introduction du produit par voie intraveineuse.* — Le cobaye, couché sur le dos, est solidement attaché à la table d'opération. On fixe une aiguille dans la veine jugulaire, sans précaution d'asepsie, car on ne laissera l'animal qu'une fois mort. On injecte 5 milligrammes par kilogramme (solution à 1 p. 100) du produit à essayer. Cette dose a été fixée d'après les essais effectués avec le 929 F. Une dose plus faible ne protège pas l'animal ; une dose plus forte ne le protège pas plus et risque, au contraire, de l'intoxiquer, la toxicité de tous ces produits étant très élevée. Cinq minutes après cette première intervention, on injecte dans la veine une dose minima mortelle d'histamine : 0 milligr. 5 ou 1 milligramme suivant la série de cobayes. Si l'animal ne meurt pas et fait un choc, on attend qu'il soit un peu rétabli (cinq à dix minutes), puis on donne successivement, et dans les mêmes conditions, 1,5 dose minima mortelle, 2 doses minima mortelles, etc., jusqu'à la mort. On obtient alors des résultats cons-

TABLEAU II.

DATE de l'expérience	NUMÉRO du cobaye	POIDS en grammes	D. M. M. en milligramme	RÉSULTATS		
				1 d. m. m.	2 d. m. m.	3 d. m. m.
23 novembre 1938 .	1	520	1	V	V	+
23 novembre 1938 .	2	545	1	V	V	+
17 octobre 1938 . .	3	350	1	V	+	
17 octobre 1938 . .	4	360	1	V	V	+
17 octobre 1938 . .	5	400	1	V	V	+
23 décembre 1938 .	6	605	0,5	V	+	
23 décembre 1938 .	7	475	0,5	V	V	+
11 janvier 1938. . .	8	540	0,5	V	V	+
11 janvier 1938. . .	9	460	0,5	V	V	+

V, survie. +, mort.

tants. Un même produit protège les cobayes contre une dose d'histamine qui est toujours sensiblement le même multiple de la dose minima mortelle. Ce multiple reste le même si l'on opère avec des cobayes succombant sans protection à 0 milligr. 5 par kilogramme d'histamine, ou avec ceux succombant avec 1 milligramme par kilogramme.

Remarquons qu'il n'y a pas désensibilisation du cobaye à l'histamine par l'injection de faibles doses non mortelles avant l'administration de la dose mortelle. Les cobayes protégés par le 929 F résistent à l'injection de 2 doses minima mortelles précédées ou non d'une plus faible dose d'histamine.

Il n'y a pas non plus addition de l'effet toxique : l'animal protégé succombe à 3 doses minima mortelles précédées ou non de doses plus faibles.

B — ACTION DE LA ISOPROPYL(5)MÉTHYLPHÉNOXYÉTHYLDIÉTHYLAMINE (929 F) ET DE LA NPHÉNYLNÉTHYLN'DIÉTHYLÉTHYLÈNEDIAMINE.

Cette technique nous a permis de constater, une fois de plus, la supériorité du 929 F sur les autres dérivés de la phénoxyéthyldiéthylamine : c'est le seul de ces composés, avec son isomère, la (2)méthyl(5)isopropylphénoxyéthyldiéthylamine (1379 F), à protéger les cobayes contre 2 doses minima mortelles d'histamine. Elle permet aussi de placer son activité au-dessus de celle de l'atropine, dont la propriété protectrice vis-à-vis du choc histaminique du cobaye avait déjà été mise en évidence par la Barre [5], puis Dale et Laidlaw [23]. Dans nos essais, 5 milligrammes par kilogramme d'atropine n'ont protégé le cobaye que contre 1 dose minima mortelle d'histamine.

Elle nous a permis, enfin, de placer au-dessus de cette activité celle d'une substance de constitution chimique totalement différente : la NphénylNéthylN'diéthyléthylènediamine (1571 F), dont 5 milligrammes, injectés dans la veine, protègent le cobaye contre 3 et 4 doses minima mortelles d'histamine.

Ce même 1571 F essayé par voie sous-cutanée pour protéger le cobaye contre le choc histaminique s'est montré plus actif

TABLEAU III.

DATE de l'expérience	NUMÉRO du cobaye	POIDS en grammes	D. M. M. en milligramme	NOMBRE DE D. M. M. reçues par le cobaye				
				1	2	3	4	5
17 octobre 1938 . . .	1	400	1	V	V	+		
18 octobre 1938 . . .	2	425	1	V	V	V	V	+
18 octobre 1938 . . .	3	350	1	V	V	V	+	
22 novembre 1938 . .	4	520	0,5	V	V	V	V	+
22 novembre 1938 . .	5	345	0,5	V	V	V	+	
26 janvier 1939 . . .	6	610	0,3	V	V	V	+	
26 janvier 1939 . . .	7	550	0,3	V	V	V	V	+
26 janvier 1939 . . .	8	575	0,3	V	V	V	+	

+, mort; V, survie.

là encore que le 929 F, puisque, sur les 5 cobayes protégés, aucun n'a présenté le moindre choc, contrairement à ce qui se passe avec le 929 F.

TABLEAU IV.

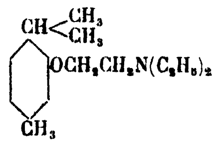
NUMÉROS	POIDS en grammes	1571 F en milligrammes	HISTAMINE en milligramme	OBSERVATIONS
1.	610		0,5	Mort en 3 minutes.
2.	710		0,5	Mort en 4 minutes.
3.	630		0,5	Mort en 7 minutes.
4.	630	40	0,5	Pas de choc, survie.
5.	600	40	0,5	Pas de choc, survie.
6.	615	40	0,5	Pas de choc, survie.
7.	720	40	0,5	Pas de choc, survie.
8.	645	40	0,5	Pas de choc, survie.

C. — RELATION ENTRE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET L'ACTION ANTITOXIQUE.

Nous trouvant en possession de ces deux produits nettement actifs sur le choc histaminique du cobaye, nous nous sommes demandé comment les variations chimiques apportées à la formule de chacun de ces corps influençaient l'action antitoxique observée sur le cobaye.

1° LA (2)ISOPROPYL(5)MÉTHYLPHÉNOXYÉTHYLDIÉTHYLAMINE (929 F)

ET LES DÉRIVÉS VOISINS. — Deux sortes de modifications peuvent être effectuées sur la formule chimique de la (2)isopropyl (5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F) :



a) Une série d'opérations portant sur la chaîne aminée.

b) Une série de modifications portant sur le noyau phénol.

a) *Modifications portant sur la chaîne aminée.* — La suppression d'un des groupements éthyl dans le radical aminé amenant à une amine secondaire, supprime toute action antihistaminique : la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyléthylamine (1482 F) ne protège plus le cobaye contre une seule dose minima mortelle.

On note aussi une diminution d'action lorsqu'on remplace le groupement aminé par un groupement pipéridiné (1464 F).

b) *Modifications portant sur le noyau.* — Nos premiers essais dans cette voie portèrent sur 3 dérivés isomères de ceux précédemment étudiés :

La (2)méthyl(5)isopropylphénoxyéthyldiéthylamine (1379 F), isomère du 929 F.

La (2)méthyl(5)isopropylphénoxyéthyléthylamine (1483 F), isomère du 1482 F.

La (2)méthyl(5)isopropylphénoxyéthylpipéridine (1465 F), isomère du 1464 F.

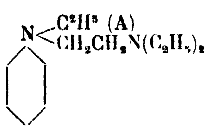
L'antagonisme, vis-à-vis de l'histamine, des isomères offre une similitude parfaite : action identique des 929 F et 1379 F, même diminution d'action apportée par le groupement pipéridine, même inaction de l'amine secondaire.

Supprimant le groupement isopropyl sur le noyau benzénique, nous avons recherché l'activité de quelques dérivés de la phénoxyéthyldiéthylamine (928 F). Nous avons essayé les méthylphénoxyéthyldiéthylamines (936 F, 1702 F, 1703 F), la paraméthoxyéthyldiéthylamine (940 F), la paraallylphénoxyéthyldiéthylamine (1274 F), les phénylphénoxyéthyldiéthylamines (1262 F, 1306 F, 1323 F), enfin la diméthyl(2-5)phénoxyéthyldiéthylamine (1655 F).

Seule a manifesté une activité la diéthylaminoéthoxy(2)diphényle (1262 F), mais son action très spéciale sur le cœur, signalée tout récemment par D. Bovet [14] l'écarte d'une étude antihistaminique.

La diméthylphénoxyéthyldiéthylamine a, elle aussi, manifesté une certaine activité — moindre toutefois que celle observée avec le 929 F. On est donc en droit de conclure à l'action favorable du groupement isopropyl.

2° La NphénylNéthylN'diéthyléthylènediamine (1571 F) et les dérivés voisins. — Les modifications portant sur le groupement aminé N' aboutissent aux mêmes conclusions dans cette série que dans celle des phénoxyéthylamines : les amines secondaires et tertiaires se montrant bien inférieures aux amines tertiaires. Ceci posé, deux modifications peuvent être apportées à la formule du 1571 F :



a) Le remplacement du groupement éthyl (A) par d'autres alcoyls et même par un hydrogène ;

b) L'apport de quelques groupements sur le noyau.

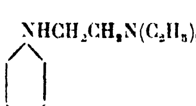
a) *Variation du groupement* (A). — Dans cette série, nous avons trois produits :

Le 1167 F, où l'éthyl est remplacé par un hydrogène ; totalement inactif sur le choc histaminique.

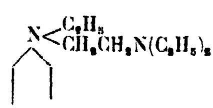
Le 1335 F, où l'éthyl est remplacé par un groupement méthyl ; l'action antitoxique commence à apparaître, mais est encore très faible.

Le 1709 F, où le groupe éthyl est remplacé par un isopropyl ; ce corps est moins actif que le 1571 F.

b) *Modifications portant sur le noyau même.* — Deux cas sont alors à considérer suivant que l'on part du 1167 F ou du 1571 F.



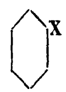
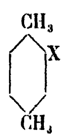
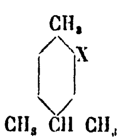
1167 F.



1571 F.

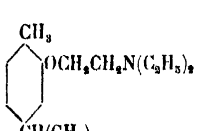
Dans le premier cas, les résultats sont exactement superposables à ceux obtenus avec la phénoxyéthylamine : l'addition d'un groupe méthyl en quelque position qu'il se trouve par rapport à la fonction aniline, n'apporte aucune augmentation à l'action antihistaminique. Celle-ci commence à se manifester

TABLEAU V.

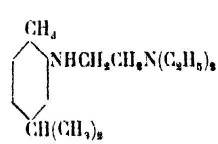
FORMULES	$X = OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	$X = NHCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	$X = N\begin{cases} C_2H_5 \\ CH_2CH_2N(C_2H_5)_2 \end{cases}$
	928 F. I. ah = 1.	1167 F. I. ah = 1.	1571 F. I. ah = 4.
	1702 F. I. ah = 1.	1332 F. I. ah = 1.	1599 F. I. ah = 1,5.
	1655 F. I. ah = 2.	1656 F. I. ah = 2.	1670 F. I. ah = 1,5.
	1379 F Isomère du 929 F. I. ah = 3.	1691 F. I. ah = 3.	1699 F. I. ah = 1.

I. ah, indice antihistaminique = nombre de doses mortelles nécessaires pour tuer l'animal protégé par 5 milligrammes du produit injecté dans la veine.

lorsqu'on ajoute un nouveau groupement méthyl au noyau, leur position n'ayant d'ailleurs pas d'influence. Enfin on retrouve toute l'activité du 929 F lorsqu'on arrive à la N(5)iso-



1379 F.

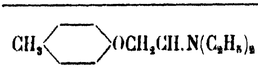
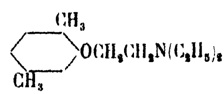
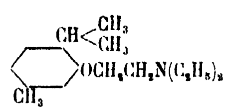
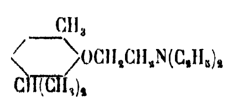
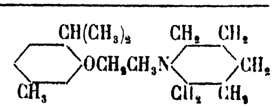
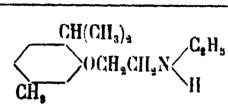


1691 F.

propyl(2)méthylphénylN'diéthyléthylènediamine (1691 F) dont la constitution rappelle tout à fait celle du 1379 F, isomère du 929 F et d'activité antitoxique identique.

L'isomère du 1691 F correspondant au 929 F n'a pas été

TABLEAU VI.

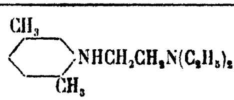
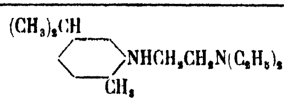
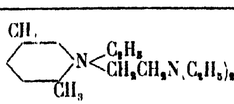
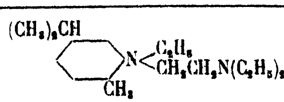
NUMÉRO du produit	NOM DU PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	TOXICITÉ (LAPIN) en gramme par kilogramme		I. A. H.
			D. M. T.	D. m. m.	
928 F	Phénoxyéthyl-diéthylamine.		0,015	0,055	1
936 F	Méthyl(4)phénoxyéthyl-diéthylamine.		0,010	0,040	1
1655 F	Diméthyl(2-5)-phénoxyéthyl-diéthylamine.		0,010	0,020	2
929 F	Isopropyl(2)méthyl(5)-phénoxyéthyl-diéthylamine.		0,005	0,025	3
1379 F	Méthyl(2)isopropyl(5)-phénoxyéthyl-diéthylamine.		0,005	0,025	3
1464 F	Isopropyl(2)méthyl(5)-phénoxyéthylpipéridine.		0,010	0,030	2
1482 F	Isopropyl(2)méthyl(5)-phénoxyéthyléthylamine.		0,010	0,035	1

D. M. T., dose maxima tolérée, D. m. m., dose minima mortelle, I. a. h., indice antihistaminique (choc).

étudié. Sa préparation chimique offrait de grosses difficultés et tout fait supposer qu'il ne se différencie pas plus de son isomère que le 929 F ne se différencie du 1379 F.

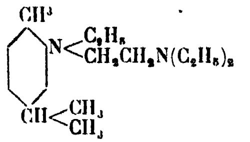
Nous avons été vivement frappée par un tel parallélisme,

TABLEAU VII.

NUMÉRO du produit	NOM DU PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	TOXICITÉ lapins (I. V.) en gramme par kilogramme D. M. T.	D. m. m.	I. A H.
1167 F	Nphenyl-N'diéthyl-éthylènediamine.		0,015	0,050	1
1332 F	Nméthyl(3)phényl-N'diéthyl-éthylènediamine.		0,005	0,030	1
1656 F	Ndiméthyl(2-5 phényl-N'diéthyléthylène-diamine.		0,005	0,030	2
1691 F	Nméthyl(2)isopropyl(5)-phénylN'diéthyl-éthylènediamine.		0,010	0,020	3
1718 F	Nisopropyl(4)phényl-N'diéthyléthylène-diamine.		0,0025	0,025	1
1335 F	NphénylNméthyl-N'diéthyléthylène-diamine.		0,010	0,040	1,5
1571 F	NphénylNéthyl-N'diéthyléthylène-diamine.		0,005	0,025	4
1551 F	NphénylNéthyl-éthylènediamine.		0,020	0,060	1
1599 F	Nméthyl(2)phényl-NéthylN'diéthyl-éthylènediamine.		0,005	0,020	2
1670 F	Ndiméthyl(2-5)phényl-Néthyl-N'diéthyl-éthylènediamine.		0,0025	0,020	1,5
1699 F	Nméthyl(2)isopropyl(5)-NéthylN'diéthyl-éthylènediamine.		0,0025	0,015	1
1709 F	NphénylNisopropyl-N'diéthyléthylène-diamine.		0,002	0,015	3

D. M. T., dose maxima tolérée; D. m. m., dose minima mortelle; I. a. h., indice antihistaminique (choc).

présenté par l'activité de ces deux séries de corps, aussi placions-nous de gros espoirs dans les produits de constitutions semblables dérivés de la NphénylNéthylN'diéthyléthylène-diamine (1571 F), le point de départ possédant cette fois une grande activité. Quelle ne devrait pas être celle du 1699 F dont la formule se rattachait à celles du 1379 F et du 1691 F.



1699 F.

Or, le 1699 F essayé sur le cobaye ne révéla aucune action protectrice contre le choc histaminique.

Étudiant les autres produits dans cette série de modifications, nous nous aperçûmes que déjà la présence d'un groupement méthyl sur le noyau diminuait considérablement l'activité antitoxique. Là encore la position ne joue aucun rôle — l'adjonction d'un second groupement méthyl ne modifie pas, cette fois, l'action du produit

3° CONCLUSIONS. — Les résultats obtenus avec les dérivés du 929 F peuvent être résumés dans le tableau V.

La divergence présentée par la troisième série avec les deux autres ne semble pas imputable à la seule fantaisie d'une science aussi capricieuse que la pharmacologie. Nous verrons, dans un prochain chapitre, qu'en rapprochant ces résultats d'un ensemble d'autres observations, il est peut-être possible d'en tirer quelques éclaircissements sur le mode d'action de ces divers produits.

II

RAPPORTS ENTRE L'ACTION ANTITOXIQUE ET L'ACTION ANTIHISTAMINIQUE PRÉSENTÉES SUR DIVERS ORGANES

Voilà donc deux produits chimiques, la (2)isopropyl(5)méthyl-phénoxyéthyldiéthylamine (929 F) et la NphénylNéthylN'dié-thyléthylènediamine (1571 F) très actifs sur le choc histami-

nique expérimental du cobaye, et quelques autres qui présentent une activité plus ou moins prononcée. Pourrons-nous leur appliquer pour autant le qualificatif d'antihistaminiques ? Nous avons insisté en effet, au début de ce travail, sur la multiplicité des actions de l'histamine dans l'organisme animal ; le fait que le 929 F et le 1571 F protègent le cobaye contre le choc histaminique n'implique pas qu'ils agissent en antagonistes vis-à-vis de toutes les manifestations de l'histamine. Pour nous éclairer sur ce point, nous nous sommes limitée dans ce travail à l'action des 929 F et 1571 F sur le spasme histaminique des muscles lisses, et sur quelques manifestations vasculaires de ce poison. Nous avons, en outre, comparé les activités antitoxiques de quelques produits avec leurs actions antagonistes observées sur l'intestin ou les bronches de cobaye.

A. — Action du 929 F et du 1571 F sur les muscles lisses.

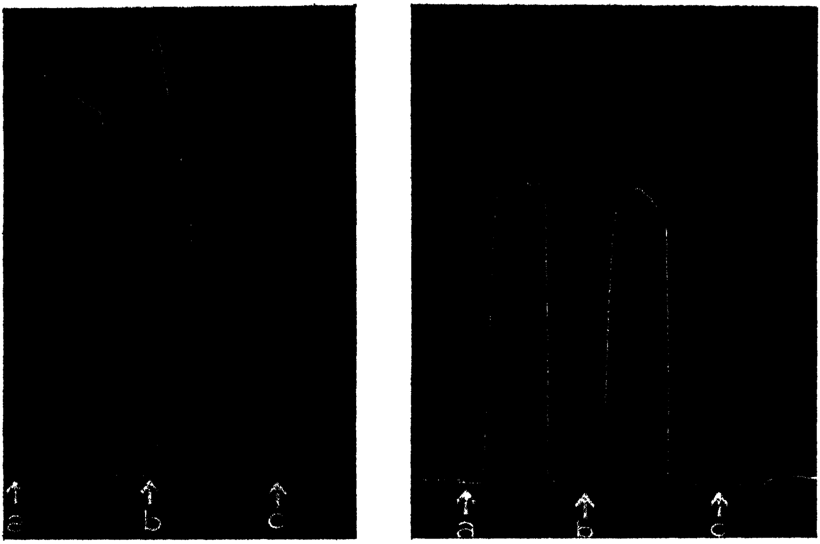
1° Intestin de cobaye isolé. *Action du 929 F.* — Cette action, déjà mentionnée, peut être résumée dans le tableau suivant :

Tableau VIII

CONCENTRATION en histamine (milligramme dans un bain de 100 cent. cubes)	CONCENTRATION en 929 F (milligramme dans un bain de 100 cent. cubes)	EFFET SUR L'INTESTIN
0,01.	0	Contraction maxima.
0,01.	0,01	Contraction maxima ou légèrement diminuée.
0,01.	0,05	Très faible contraction ou contraction nulle.
0.01.	0,1	Contraction nulle.
0,01.	1	1 dose d'histamine, dix fois plus forte, est sans action.

Action du 1571 F. — Le tableau précédent pourrait être appliqué aux résultats obtenus avec le 1571 F, l'activité de ce produit se montrant, en effet, tout à fait semblable à celle du 929 F : 0 milligr. 01 ou 0 milligr. 02 ajoutés au bain de 100 cent. cubes diminuent déjà l'action de 0 milligr. 01 d'histamine ; cette action est complètement supprimée par 0 milligr. 05 de 1571 F (Graphique II).

2° Intestin et estomac *in situ*. — Sur le chien endormi au chloralose nous avons pu mettre en évidence l'action du 929 F sur le spasme intestinal provoqué par l'injection dans la veine saphène de 0 milligr. 004 par kilogramme d'histamine : le péristaltisme intestinal est enregistré grâce à un ballon plein d'eau introduit dans une anse intestinale. Le spasme n'apparaît plus du tout lorsqu'on a injecté préala-



A B

Graphique II. — Intestin de cobaye isolé, bain de 100 cent. cubes. A, action de 0 milligr. 01 d'histamine dans la solution pure (*a*, *b*) et additionnée de 0 milligr. 05 de 929 F (*c*); B, action de 0 milligr. 01 d'histamine dans la solution pure (*a*, *b*) et additionnée de 0 milligr. 05 de 1571 F (*c*).

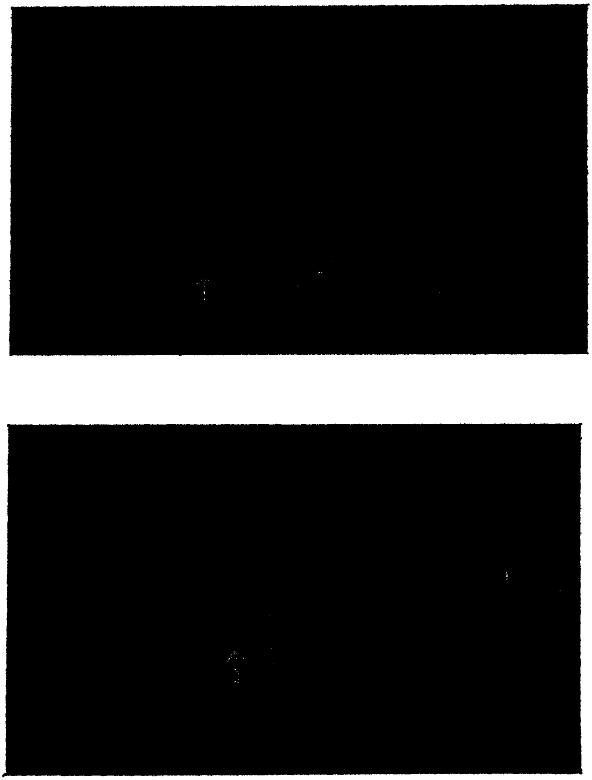
blement à l'animal 5 milligrammes par kilogramme de 929 F dans la veine (Graphique III).

Une même méthode nous a permis de constater l'action préventive du 929 F sur les spasmes stomacaux provoqués par l'histamine chez le cobaye.

3° Utérus isolé de cobaye. — L'utérus est prélevé sur une femelle non gravide, assommée puis saignée par section des carotides ; les cornes utérines sectionnées au niveau de la

trompe sont immédiatement plongées dans une solution de Tyrode glucosée tiède, puis suspendues chacune à l'extrémité du stylet inscripteur, tout en plongeant dans un bain d'une solution de Tyrode de 50 cent. cubes (NaCl, 8; $CaCl_2$, 0,20;

A



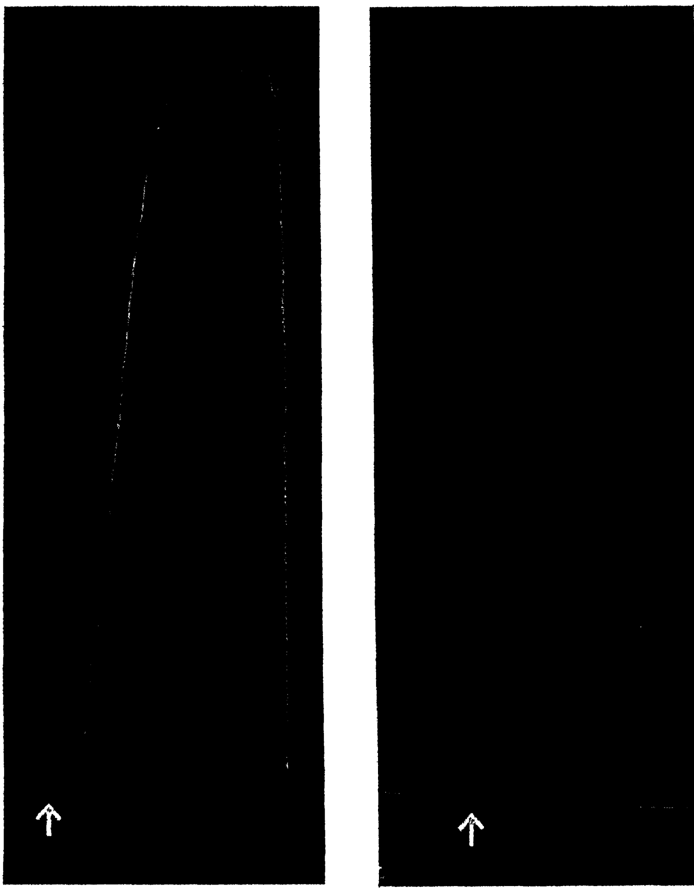
B

GRAPHIQUE III. — Action du 929 F sur le spasme histaminique de l'intestin de chien *in situ*. A, en ⅄ injection de 0 milligr. 004 par kilogramme d'histamine dans la veine saphène; B, l'animal a reçu 5 milligrammes par kilogramme de 929 F dans la veine. Même injection d'histamine en ⅄.

KCl, 0,20; $MgCl_2$, 0,01; CO_3NaH, 1; PO_4Na_2H, 0,05; glucose, 1, eau, q. s. pour 1.000) maintenu à 38°.

L'action antihistaminique du 929 F est moins manifeste sur l'utérus que sur l'intestin de cobaye ; en effet, les doses de

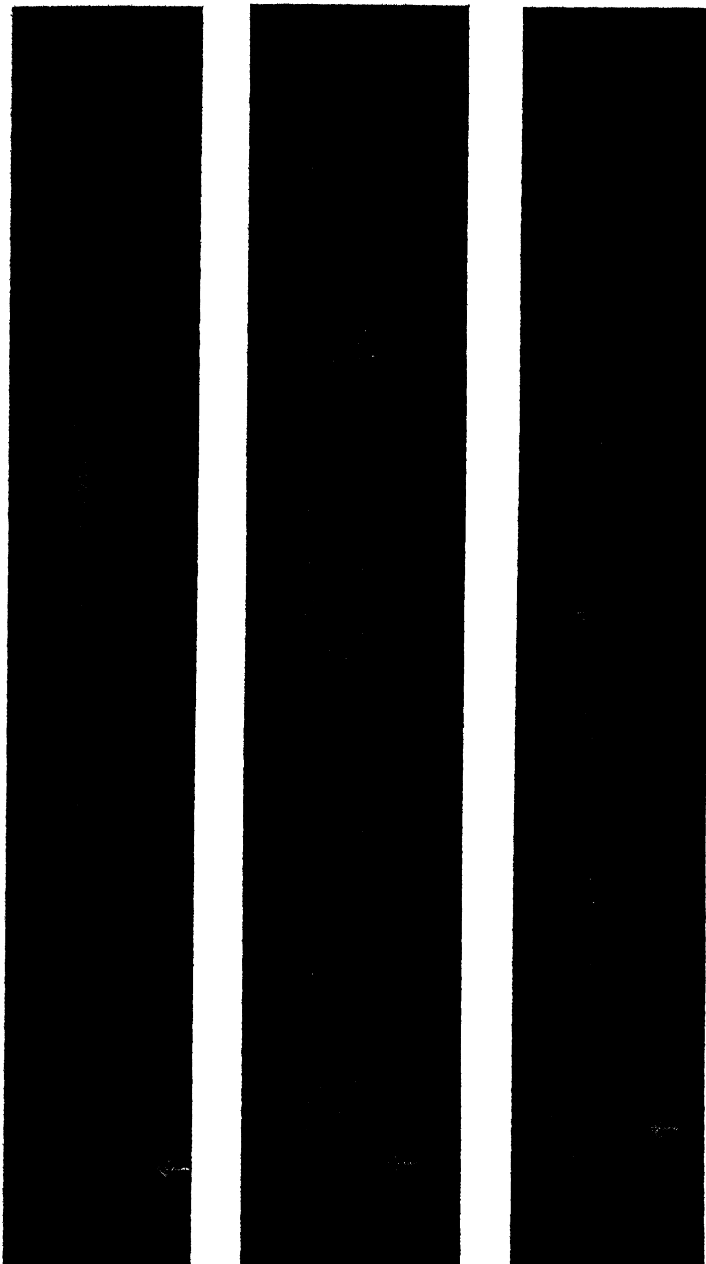
l'ordre du dixième de milligramme ne modifient pas la réponse utérine contrairement à ce qui se passe sur l'intestin. Toutefois, nous avons pu constater la disparition de l'action histaminique (0 milligr. 01) après un bain de deux heures dans



A B

Graphique IV. — Utérus de cobaye isolé, bain de 50 cent. cubes. A, histamine 0 milligr. 01 dans un bain d'une solution de Tyrode; B, histamine 0 milligr. 01 après deux heures dans un bain de 929 F (0 milligr. 5 dans 50 cent. cubes de solution de Tyrode).

une solution de Tyrode additionnée de 929 F (0 milligr. 5 dans 50 cent cubes).



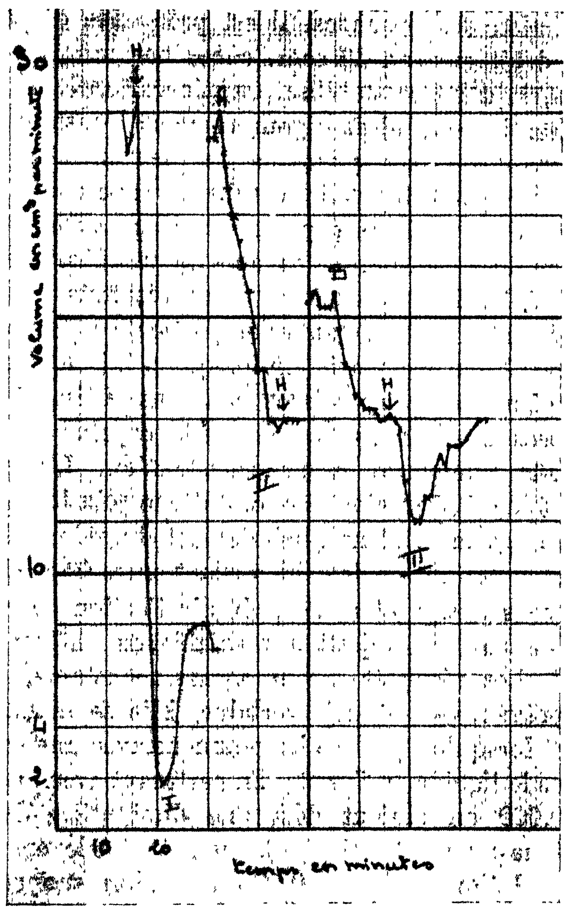
GRAPHIQUE V. — Action du 929 F sur le spasme bronchique histaminique (bronches *in situ*). *1re ligne*, action de 0 milligr. 05 d'histamine ; *2e ligne*, après 5 milligrammes de 929 F, action de 0 milligr. 05 d'histamine ; *3e ligne*, après 5 milligrammes de 929 F, action de 5 milligrammes d'histamine.

Néanmoins, la dose de 0 milligr. 01 d'histamine provoque rarement la contraction maxima de l'utérus ; pour obtenir celle-ci, il faut doubler la dose, la concentration précédente du bain en 929 F ne suffit plus alors pour prévenir l'action, et l'on est obligé d'employer des doses de 929 F provoquant par elles-mêmes une excitation utérine (2 milligrammes pour 50 cent. cubes). Pour obvier à cet inconvénient et mettre en évidence l'action antihistaminique, nous avons eu recours à l'expédient suivant : on ajoute au bain 2 milligrammes de 929 F, l'utérus se contracte. Après quelques minutes on remplace le bain par une solution de Tyrode pure : l'utérus se relâche, l'histamine ajoutée alors provoque une contraction; mais, si l'on a soin d'ajouter au préalable au bain une faible dose de 929 F sans action propre (0,25 à 0 milligr. 5), l'histamine ne provoque plus aucune contraction.

L'action antihistaminique du 1571 F n'a pu être étudiée sur cet organe, car son action œcytocique plus forte encore que celle du 929 F offre des difficultés d'autant plus grandes dans cette étude.

4° Bronches de cobaye. — a) *Action du* 929 F *sur les bronches* in situ *du cobaye*. — La broncho-constriction est mesurée par la méthode de Cordier [**19**]. L'animal endormi à l'uréthane est introduit dans un bocal sans fond, sa tête sortant par le goulot. La peau, sectionnée circulairement à la partie supérieure du cou, est rabattue et liée sur le col du bocal. Le fond de celui-ci est fermé par un bouchon et sa cavité mise en communication avec un petit spiromètre enregistreur. Il est bon de combler avec de l'eau la plus grande partie de l'espace laissé libre dans le bocal, et nécessaire d'assurer et de vérifier la constance de la température. Cet appareil enregistre les variations de volume du poumon. On pratique la respiration artificielle à travers une canule introduite dans la trachée : la force de la pompe restant constante, la diminution d'amplitude des mouvements respiratoires indiquera bien la plus ou moins grande constriction des bronches. Le graphique V indique mieux que n'importe quel commentaire l'action de 5 milligrammes par kilogramme de 929 F sur le spasme provoqué par 0 milligr. 05 par kilogramme d'histamine (graphique V).

b) *Action du 929 F sur les poumons isolés de cobaye.* — Nous avons suivi la méthode déjà utilisée par Sollmann [71], Tainter [78], Thornton [79], Warnant [88],, J. Lévy [52], etc. On prélève les poumons sur un cobaye préalablement saigné



GRAPHIQUE VI. — *Poumons perfusés.* Courbes du débit. I, perfusion avec une solution de Tyrode pure en H, injection dans le tube d'arrivée aux poumons de 1 milligramme d'histamine. II, perfusion avec une solution de 929 F (1/100.000) à partir de A; en H, injection de 1 milligramme d'histamine. III, perfusion avec une solution de 1 571 F (1/100.000) à partir de B; en H, injection de 1 milligramme d'histamine.

par section des carotides. On les perfore de quelques trous au moyen d'une grosse aiguille, puis après avoir fixé une canule

dans la trachée, on les perfuse avec une solution de Tyrode non glucosée (NaCl, 9 gr.; KCl, 0 gr. 42; $CaCl_2$, 0 gr. 24; $MgCl_2$, 0 gr. 005; Co_3NaH, 0 gr. 5; eau, q. s. pour 1 litre), maintenue à 38° et sous pression constante. Le volume du perfusat recueilli toutes les minutes permet de mesurer l'état de constriction des bronches. Il est préférable d'opérer avec un faible débit environ 20 cent. cubes par minute. Dans ces conditions, le débit se stabilise, en général après une dizaine de minutes, il reste alors rigoureusement constant ; s'il ne peut se stabiliser, ces poumons ne peuvent être utilisés. L'histamine est injectée dans le tube de caoutchouc amenant la solution de Tyrode aux poumons. Nous avons essayé de trouver une dose d'histamine capable de produire une contraction réversible. Malheureusement, les résultats obtenus par ce procédé sont très inconstants ; en particulier, on ne retrouve pas la même bronchoconstriction lorsqu'on injecte deux fois de suite la même dose aux mêmes poumons. Laissant donc les faibles doses nous avons cherché celle capable de produire à coup sûr une forte bronchoconstriction. L'injection de 1 milligramme d'histamine (0 c. c. 5 d'une solution à 2/1.000) produit un spasme violent généralement durable et se traduisant par une diminution de débit variant entre 40 et 100 p 100.

Nous avons essayé alors de prévenir l'action de cette dose d'histamine par une injection préalable de différentes doses de 929 F. Les résultats furent assez inconstants, bien que l'action préventive soit déjà certaine. Elle se manifeste plus clairement lorsqu'on perfuse les poumons avec une solution de 929 F dans le liquide de Tyrode. En perfusant avec une solution à 1/1.000.000 on obtient déjà une diminution de l'action histaminique ; mais l'action est surtout visible en perfusant avec une solution à 1/100.000. On peut alors supprimer totalement l'action de 1 milligramme d'histamine sur les bronches, comme l'indique la courbe retracée dans la figure VI.

Les résultats de 10 expériences sont rapportés dans le tableau ci-contre.

c) *Action du* 1571 F *sur les bronches isolées de cobaye.* — La méthode utilisée pour le 929 F nous a permis d'étudier l'action du 1571 F sur la bronchoconstriction histaminique.

Nous avons obtenu en général une action moins fortement

TABLEAU IX.

EXPÉRIENCE	LIQUIDE PERFUSANT	DÉBIT avant 1 milligr. d'histamine (cent. cubes par minute)	DÉBIT après 1 milligr. d'histamine (cent. cubes par minute)	DIFFÉRENCE p. 100	MOYENNE p. 100
1.	Tyrode pur.	17,5	7,5	60	
2.	Tyrode pur.	17	0	100	
3.	Tyrode pur.	22,5	12,5	40	79
4.	Tyrode pur.	13,5	5	63	
5.	Tyrode pur.	27	2	94	
6.	Solution à 1/100.000 de 929 dans le Tyrode.	17,5	17,5	0	
7.	Id.	16	16	0	
8.	Id.	24	21	12,5	9
9.	Id.	14	9	33	
10	Id.	17	17	0	

protectrice qu'avec le 929 F : la moyenne de 5 expériences donne une bronchoconstriction histaminique de 18 p. 100, alors qu'elle n'était que de 9 p. 100 avec les poumons perfusés par le 929 F.

TABLEAU X.

EXPÉRIENCE	LIQUIDE PERFUSANT	DÉBIT avant 1 milligr. d'histamine (cent. cubes par minute)	DÉBIT après 1 milligr. d'histamine (cent. cubes par minute)	DIFFÉRENCE p. 100	MOYENNE p. 100
1.	Tyrode pur.	17,5	7,5	60	
2.	Tyrode pur.	17	0	100	
3 . . .	Tyrode pur.	22,5	12,5	40	79
4.	Tyrode pur.	13,5	5	63	
5.	Tyrode pur.	27	2	94	
6.	1571 F (1/100.000) dans le Tyrode.	17,5	16	8	
7.	Id.	14	14	0	
8.	Id.	13	7,8	38	18,5
9.	Id.	16	12	25	
10.	Id.	19,5	16	22	

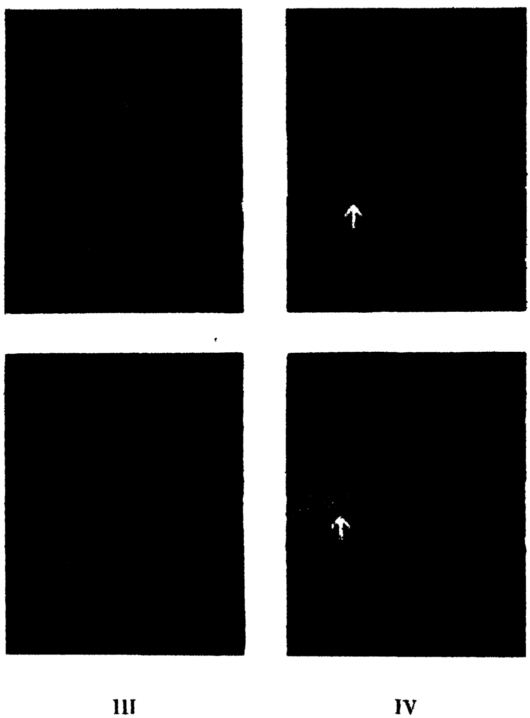
B. — ACTION DU 929 F ET DU 1571 F SUR QUELQUES EFFETS VASCULAIRES DE L'HISTAMINE.

1° PRESSION ARTÉRIELLE. — Les résultats dans cette voie furent en général négatifs. L'hypotension provoquée chez le chien chloralosé par 0 milligr. 02 d'histamine par kilogramme

n'est pas diminuée par 10 milligrammes de 929 F ou de 1571 F. Sur le lapin endormi au « narcosol » (sel de sodium de l'acide éthobutyléthylbarbiturique) l'hypotension histaminique est même sensibilisée par une injection préalable de 5 et 10 milligrammes de 929 F et 1571 F.

Par contre, toutes les fois que nous avons pu obtenir une

I II



III IV

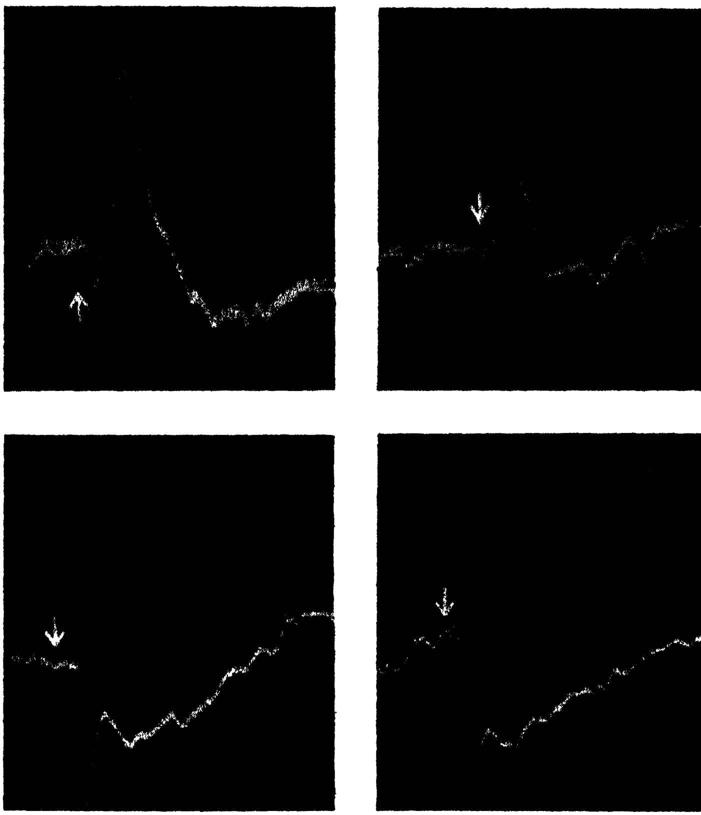
GRAPHIQUE VII. — Pression artérielle de lapin (narcose à l'uréthane 1 gramme par kilogramme intrapéritonéale). I, action de 0 milligr. 05 d'histamine; II, action de 0 milligr. 05 d'histamine après 1 milligramme par kilogramme de 929 F; III, action de 0 milligr. 05 d'histamine après 2 milligrammes par kilogramme de 929 F; IV, action de 0 milligr. 05 d'histamine après 5 milligrammes par kilogramme de 929 F.

hypertension par injection d'histamine dans la veine d'un lapin, le 929 F et le 1571 F l'ont supprimée et même le plus souvent inversée.

Cette hypertension histaminique a été décrite par de nom-

breux auteurs : Dale et Laidlaw [24], Ackermann et Kutscher [1], et tout récemment encore par Fujikawa [37], toutes les fois que le lapin est profondément endormi. L'éther et l'uréthane

I II



III IV

Graphique VIII. — Pression artérielle de lapin (narcose à l'uréthane 1 gramme par kilogramme intrapéritonéale). I, action de 0 milligr. 05 par kilogramme d'histamine; II, action de 0 milligr. 05 par kilogramme d'histamine après 1 milligramme de 1571 F; III, action de 0 milligr. 05 par kilogramme d'histamine après 2 milligrammes de 1571 F; IV, action de 0 milligr. 05 par kilogramme d'histamine après 5 milligrammes de 1.571 F. Injections intraveineuses dans la veine marginale de l'oreille.

donnent des résultats plus constants, mais il nous est arrivé aussi d'obtenir une hypertension histaminique avec le « nar-

cosol ». Cet effet n'est pas supprimé par l'injection préalable d'un sympatholytique, on ne peut donc pas l'attribuer à une décharge d'adrénaline. Dale et Laidlaw lui donnent pour base une vasoconstriction des vaisseaux internes (intestinaux en particulier). L'affaiblissement de la bronchoconstriction, responsable de l'hypotension chez l'animal éveillé, permettrait à la vasoconstriction de se manifester par l'hypertension observée. Cette explication serait-elle conciliable avec les expériences plus récentes de Klisiecki et Holobut [45] qui attribuent au cœur le principal rôle dans l'hypotension histaminique ?

Quoi qu'il en soit, dès la dose de 1 milligramme par kilogramme, le 929 F, comme le 1571 F, diminue très fortement l'action hypertensive de l'histamine. Après 2 milligrammes, l'action hypertensive fait place à une faible action hypotensive. Après de plus fortes doses l'hypotension s'accentue. Cette hypotension n'est pas d'origine vagale, car l'atropine ni la section des vagues ne peuvent la supprimer.

2° Effets locaux cutanés. — Le Dr Joltrain (3), Ch Henry et nous-même avons essayé l'action du 929 F sur les effets dermiques de l'histamine.

Nous avons tout d'abord cherché à prévenir l'apparition du placard urticarien classique provoqué par l'ionisation à l'histamine. Soit que nous ayons fait pénétrer le 929 F dans la peau par ionisation préalable, soit que nous ayons mélangé le 929 F avec l'histamine sur la compresse servant à l'ionisation, soit que nous ayons fait absorber un cachet de 1 milligr. 5 de 929 F une heure avant l'ionisation à l'histamine, nos résultats furent toujours négatifs. Le placard apparaît toujours avec la même intensité.

Nous n'avons jamais pu observer non plus un changement quelconque de la triple réaction de Lewis provoquée par intradermo- ou cutiréaction à l'histamine lorsque nous avons injecté simultanément ou préalablement le 929 F.

Les résultats furent aussi négatifs avec le 1571 F.

(3) Tous les essais dermatologiques ont été effectués chez le Dr Joltrain et sous sa direction ; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

C. — Comparaison entre les actions antihistaminiques manifestées sur les muscles lisses et les actions antitoxiques de quelques dérivés.

Comparant les résultats expérimentaux obtenus dans les expériences précédemment décrites avec le 929 F et le 1571 F sur l'intestin, les bronches et le choc histaminique du cobaye, on obtient les valeurs ci-contre :

	Nombre de d. m. m. nécessaires pour tuer l'animal	Bronchoconstriction produite par 1 milligramme d'histamine *in vitro* p. 100	Doses en milligramme annulant l'action de 0 milligr. 01 d'histamine sur l'intestin *in vitro*
Témoin.	1	79 (1)	
Protection par 929 F .	3	9	0,005-0,01
Protection par 1571 F .	4	18	0,005-0,01

(1) Moyenne de cinq expériences.

Les chiffres expérimentaux obtenus sur les poumons et l'intestin ne varient pas dans le même sens que l'action du produit : plus le produit est actif, en effet, plus la broncho-constriction histaminique sera faible, et plus faible aussi sera la dose nécessaire pour neutraliser l'action de l'histamine sur l'intestin. Il nous a donc semblé préférable de remplacer ces résultats expérimentaux par des chiffres abstraits choisis de telle façon que leur accroissement traduise toujours une augmentation de l'activité correspondante. De tels chiffres désignés sous le nom d'indices figureront sous le nom :

1° D' « antihistaminique » (choc), déjà employé dans le tableau IV, cet indice représente le nombre de doses minima mortelles nécessaires pour tuer le cobaye protégé par 5 milligrammes du produit (intraveineux).

2° D' « antihistaminique » (bronches) , celui-ci représente la diminution pour cent de la bronchoconstriction histaminique sous l'action du produit.

3° D' « antihistaminique » (intestins), ce dernier indice est obtenu en prenant l'inverse de la dose en milligramme, néces-

saire pour supprimer l'action de 0 milligr. 01 d'histamine sur l'intestin isolé de cobaye.

Reprenant les résultats relatés plus haut pour le 929 F et le 1571 F, on obtient le tableau suivant :

TABLEAU XI.

NUMÉRO DU PRODUIT	INDICE antihistaminique (choc)	INDICE antihistaminique (bronches)	INDICE antihistaminique (intestins)
Témoin.	1	0	
929 F	3	88	100-200
1571 F	4	77	100-200

On voit alors qu'il n'y a pas concordance dans les variations des activités présentées par ces deux produits sur la toxicité, les bronches ou l'intestin. Remarquant que le 929 F et le 1571 F appartiennent à deux séries chimiques très différentes, nous nous sommes demandé si la divergence observée ne proviendrait pas de ce fait et s'il ne serait pas possible de trouver un parallélisme entre les trois actions étudiées en utilisant des produits appartenant à une même série chimique.

Le tableau XII relate les résultats obtenus avec les 11 corps étudiés sur l'intestin.

TABLEAU XII.

NUMÉRO du produit	SÉRIE CHIMIQUE	DOSES en milligramme annulant l'action de 0 milligr. 01 d'histamine	INDICE anti-histaminique (intestin)	INDICE anti-histaminique (choc)
929 F	Phénoxyéthylamine.	0,005-0,01	100-200	3
1379 F.	Phénoxyéthylamine.	0,005-0,01	100-200	3
1655 F.	Phénoxyéthylamine.	0,04	25	2
1482 F.	Phénoxyéthylamine.	0,04	25	1
928 F	Phénoxyéthylamine.	0,1-0,5	2-10	1
1571 F.	Ethylènediamine.	0,005-0,01	100-200	4
1691 F.	Ethylènediamine.	0,01-0,02	50-100	3
1335 F.	Ethylènediamine.	0,04	25	1,5
1599 F.	Ethylènediamine	0,04-0,05	20-25	1,5
1699 F.	Ethylènediamine.	0,02	50	1
1167 F.	Ethylenediamine.	0,1	10	1

Si l'action antitoxique s'accompagne toujours d'une action antihistaminique intestinale, il est impossible de parler véri-

TABLEAU XIII.

NUMÉRO du produit	SÉRIE CHIMIQUE	BRONCHO-CONSTRICTION après 1 milligramme d'histamine p. 100 (1)	INDICE anti-histaminique (bronches)	INDICE anti-histaminique (choc)
Témoin.		79	0	1
929 F	Phénoxyéthylamine.	9,7	88	3
1655 F	Phénoxyéthylamine.	48,9	36	2
1482 F	Phénoxyéthylamine.	68	14	1
1571 F	Ethylènediamine.	18	77	4
1335 F	Ethylènediamine.	82	0	1,5
1599 F	Ethylènediamine.	88	0	1,5

(1) Moyenne obtenue sur cinq poumons avec une solution au 1/100.000 du produit dans le liquide de Tyrode.

tablement de parallélisme entre les deux séries d'indices. Notons en particulier que l'indice intestinal demeure encore élevé chez des produits dépourvus de toute action sur la toxicité, tels : le 1482 F et le 1199 F.

Le tableau XIII groupant les résultats obtenus sur les bronches isolées met en évidence le parallélisme entre l'action antitoxique et l'action antihistaminique bronchique dans une même série chimique : phénoxyéthylamines ou éthylènediamines. Par contre, la divergence observée déjà entre les 929 F et 1571 F se retrouve en particulier pour les 1482 F et 1599 F. A action antihistaminique (choc) supérieure, les éthylènediamines manifestent une action antihistaminique bronchique inférieure à celle des phénoxyéthylamines.

D. — CONCLUSIONS.

Des observations rapportées dans ce chapitre nous pourrons tirer les conclusions suivantes :

1° L'action antihistaminique de nos produits, observée sur le choc histaminique du cobaye, se retrouve dans les manifestations de ce poison sur les muscles lisses de l'intestin des bronches et de l'utérus.

2° Cette action ne se retrouve pas sur les phénomènes vascu-

laires à l'exception du cas où l'histamine agit comme hypertenseur.

3° Si l'on ne peut parler d'un véritable parallélisme entre l'action de nos produits observée sur le choc histaminique et sur la contraction des muscles intestinaux, cela semble possible quand on s'adresse aux muscles bronchiques, à condition de comparer des produits appartenant à une même série chimique. Par contre, une divergence profonde apparaît entre les produits appartenant à l'une et l'autre série.

Le Gérant : G. Masson.

Imprimé par l'Ancne Imple de la Cour d'Appel, A. Maretheux, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France).

T. 63 NOVEMBRE 1939 N° 5

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES VARIATIONS DE VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX DE TYPE HUMAIN

par L. NÈGRE, J. BRETEY, R. LAVAUX et M[lle] SIMONET.

*(Institut Pasteur.
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)*

Au cours des recherches que nous effectuons pour identifier certaines souches de bacilles tuberculeux qui nous ont été confiées ou que nous avons isolées nous-mêmes de divers produits pathologiques, nous avons eu l'occasion d'étudier des germes d'origine humaine, atypiques par leur pouvoir pathogène prononcé pour le lapin après inoculation intraveineuse (1).

Dans le présent travail, nous nous proposons de décrire les caractères d'une souche de bacilles de Koch provenant des selles d'un enfant tuberculeux. Cette souche, bien que paraissant appartenir au type humain, a présenté, pendant les premiers mois qui ont suivi son isolement, une certaine virulence pour la poule.

Elle provenait d'un enfant (enfant D...), mort le 8 février 1937, à l'âge de cinq mois et demi, d'une lobite supérieure droite dont l'évolution a commencé à la fin du mois de

(1) Ces *Annales*, **61**, août 1938, p. 169.

novembre 1936. Cet enfant avait été séparé, dès sa naissance, de sa mère tuberculeuse, vacciné par absorption de BCG et placé dans un préventorium. Comme cette femme était gravement infectée et est morte deux mois après son accouchement, il est vraisemblable de supposer que la contamination s'était faite *in utero*. Il ne nous a pas été possible d'identifier le bacille qui a déterminé la tuberculose de la mère, mais la souche qui a été isolée des lésions pulmonaires de l'enfant avait tous les caractères d'un bacille humain typique. Elle s'est développée en colonies rugueuses et eugoniques dont les bacilles, virulents pour le cobaye, ne donnaient aucune lésion au lapin et à la poule par inoculation intraveineuse de 1 milligramme et de 0 milligr. 01.

Au début de la maladie de cet enfant, un examen microscopique, effectué le 19 décembre 1936 par l'un d'entre nous, a révélé la présence dans les selles de quelques bacilles acido-résistants. Un nouvel examen, pratiqué un mois plus tard, a montré un nombre encore plus élevé de ces germes.

Après traitement par la soude, ces selles ont été ensemencées, le 19 janvier 1937, sur le milieu de Petragnani, par M[lle] Simonet. Sur les tubes ensemencés se sont développées des colonies hémisphériques d'apparence lisse, mais non rugueuses, se détachant en bloc du milieu de culture. Comme il s'agissait de colonies à aspect lisse, ces bacilles ont été inoculés non seulement au cobaye et au lapin, mais à la poule.

Propriétés pathogènes de la souche des selles au moment de son isolement.

Expérience. — Trois cobayes sont inoculés, le 9 février 1937, sous la peau de la cuisse droite, avec 1 milligramme de cette souche. Un mois après, ils sont sacrifiés ; ils présentent de petits ganglions sous-lombaires droits, hypertrophiés, non caséeux, et de nombreuses granulations sur la rate. L'un d'eux a quelques tubercules sur les poumons. Des fragments des rates sont broyés et réinoculés sous la peau de 3 cobayes, qui meurent tuberculeux.

Expérience. — Le 15 mai 1937, 2 lapins sont inoculés dans la veine avec 0 milligr. 01 de cette souche. L'un meurt prématurément, quinze jours après, sans lésions. L'autre, sacrifié un mois après l'inoculation, présente quelques granulations sur les poumons. Les autres organes sont apparemment indemnes.

Expérience. — Deux poules sont inoculées, le 15 mars 1937, dans la veine, l'une avec 1 milligramme, l'autre avec 0 milligr. 01 de cette souche. Celle qui a reçu 1 milligramme meurt trois semaines après l'inoculation avec un amaigrissement et une cachexie prononcés. Il n'y a pas de lésions visibles sur le foie et la rate, mais les frottis de ces organes contiennent de nombreux bacilles acido-résistants. La poule inoculée avec 0 milligr. 01 est sacrifiée deux mois après l'inoculation. Elle n'est pas amaigrie et ses organes ne contiennent pas de bacilles.

La souche, isolée des selles de cet enfant et caractérisée au moment de son isolement par l'apparence lisse de ses colonies sur le milieu de Petragnani, était donc virulente pour le cobaye, comme la souche à colonies rugueuses provenant des lésions pulmonaires du même enfant, mais elle présentait, en outre, un certain pouvoir pathogène pour le lapin et pour la poule après inoculation intraveineuse, alors que la souche à colonies rugueuses en était dépourvue.

Au premier réensemencement sur le milieu de Löwenstein, les colonies de la souche isolée des selles avaient encore la même apparence lisse, mais, par la suite, elles sont devenues rugueuses aussi bien sur les milieux à l'œuf que sur pomme de terre glycérinée. En milieu liquide de Sauton, la culture de ces bacilles se développait uniquement en voile à la surface, sans trouble dans la profondeur.

Malgré ce dernier caractère, on pouvait se demander si le bacille de type humain, agent de la tuberculose de cet enfant, ne s'était pas mélangé à un bacille de type aviaire, hôte accidentel. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué deux dilutions de la suspension en eau physiologique des bacilles de la souche des selles, l'une à 0 milligr. 0001 et l'autre à 0 milligr. 00001 par centimètre cube, et nous avons ensemencé II gouttes de ces dilutions sur plusieurs tubes de milieu de Löwenstein de façon à avoir des colonies provenant d'un germe unique. Toutes celles qui se sont développées présentaient un aspect rugueux. Nous n'avons pas pu distinguer parmi elles une seule colonie à aspect lisse.

Propriétés pathogènes de la souche des selles six mois après son isolement.

Nous avons alors, six mois après son isolement, éprouvé de nouveau pour le lapin et pour la poule, la virulence de cette souche qui paraissait constituée par des germes à l'état pur.

Expérience. — Le 25 juin 1937, 2 lapins sont inoculés dans la veine, l'un avec 1 milligramme, l'autre avec 0 milligr. 01 de cette souche. Le lapin inoculé avec 1 milligramme meurt, un mois après l'inoculation, sans lésions. Sa rate contient de rares bacilles. Celui inoculé avec 0 milligr. 01 est sacrifié deux mois après l'inoculation et n'a pas de lésions.

Expérience. — Une poule reçoit, le 25 juin 1937, dans la veine, 1 milligramme de cette souche. Elle meurt, trois semaines après l'inoculation, amaigrie, sans lésions macroscopiques des organes, mais avec d'assez nombreux bacilles dans le foie et dans la rate.

Cette souche avait donc conservé pour la poule à peu près le même pouvoir pathogène qu'au moment de son isolement, six mois auparavant. Nous avons, d'autre part, constaté que la souche isolée des poumons était toujours avirulente pour la poule après inoculation intraveineuse de 1 milligramme.

Propriétés pathogènes de la souche des selles un an après son isolement.

Nous avons attendu un autre délai de six mois et nous avons de nouveau éprouvé la virulence de cette souche pour le cobaye, le lapin et la poule.

Expérience. — Trois cobayes sont inoculés, le 10 décembre 1937, sous la peau de la cuisse, avec 1 milligramme de cette souche. Ces animaux meurent au bout de six semaines environ avec des lésions tuberculeuses sur tous les organes.

Expérience. — Deux lapins sont inoculés dans la veine, le 10 décembre 1937, avec 0 milligr. 01 de cette souche. Ils sont sacrifiés cinq semaines après l'inoculation. L'un et l'autre présentent quelques tubercules sur les poumons et plusieurs granulations sur chaque rein.

Expérience. — Deux poules sont inoculées dans la veine, le 10 décembre 1937, avec 10 milligrammes de cette souche. Sacrifiées deux

mois après l'inoculation, elles n'ont aucune lésion sur leurs organes, qui ne contiennent pas de bacilles.

Après un an de réensemencements sur les milieux artificiels, le pouvoir pathogène que cette souche avait présenté pour la poule a donc complètement disparu, mais comme elle montrait une légère virulence pour le lapin, nous l'avons inoculée à cet animal par voie sous-occipitale et par voie intrapleurale.

Expérience. — Le 14 mars 1938, 4 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche. Deux d'entre eux sont sacrifiés deux mois après cette inoculation. Ils présentent chacun une dizaine de fines granulations sur les poumons. Les autres organes sont indemnes. Les deux autres lapins sont sacrifiés trois mois après l'inoculation. Leurs poumons présentent aux bases quelques rares tubercules. Les autres organes ne paraissent pas atteints.

Expérience. — Deux lapins reçoivent, le 14 mars 1938, une inoculation sous-occipitale de 0 milligr. 01 de cette souche. Ils ne présentent, par la suite, aucune paralysie. Sacrifiés deux mois après l'inoculation, ils n'ont aucune lésion.

Expérience. — Deux lapins sont inoculés, le 21 septembre 1938, dans la plèvre du côté droit avec les lésions pulmonaires broyées et émulsionnées en eau physiologique d'un lapin qui avait reçu dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche. Sacrifiés neuf semaines après cette inoculation, l'un n'a que deux petits tubercules sur la plèvre pariétale droite, l'autre deux tubercules sur la plèvre pariétale du même côté et de nombreux tubercules sur les poumons. Les autres organes sont indemnes.

La souche isolée des selles, malgré le pouvoir pathogène qu'elle a présenté pour la poule pendant les six mois qui ont suivi son isolement et la légère virulence qu'elle a montrée dans certains cas pour le lapin, se comporte donc quand on utilise les voies méningée et pleurale, comme un bacille humain typique.

Conclusions.

Il résulte de ces faits que nous avons isolé, à partir du même enfant, deux souches de bacilles tuberculeux qui ont présenté des caractères légèrement différents.

Celle qui provenait des lésions pulmonaires s'est développée sur les milieux à l'œuf en colonies rugueuses et eugoniques ; elle est virulente pour le cobaye et n'a montré aucun pouvoir

pathogène pour le lapin et pour la poule inoculés par la voie veineuse aux doses de 1 milligramme et 0 milligr. 01.

Par contre, la souche obtenue par l'ensemencement des selles sur le milieu de Petragnani a poussé sous la forme de colonies d'apparence lisse, non crémeuses, mais non adhérentes au milieu. Elles ont pris un aspect rugueux dans les réensemencements ultérieurs. Cette souche a présenté, dans certains cas, après inoculation intraveineuse de 0 milligr. 01, une virulence pour le lapin légèrement plus prononcée que celle isolée des poumons du même enfant. Pendant les six mois qui ont suivi leur isolement, ces germes inoculés à la poule, par la voie veineuse à la dose de 1 milligramme, ont tué cet animal en trois semaines avec un amaigrissement prononcé et de nombreux bacilles dans les organes.

Puisqu'on peut éliminer l'hypothèse d'une contamination de ces germes par un bacille aviaire présent dans l'intestin, il paraît ressortir de ces faits que la souche isolée des selles de l'enfant D..., quoique de type humain, a présenté, pendant les six mois qui ont suivi son isolement, un certain pouvoir pathogène pour la poule.

Comme il ne s'agit que d'un cas unique, nous ne voulons en tirer aucune conclusion et nous nous bornons à verser cette observation dans le dossier des variations de virulence des bacilles tuberculeux des mammifères.

RÉACTIONS HYPERERGIQUES D'ÉPREUVE CHEZ DES LAPINS SENSIBILISÉS PAR DES BACILLES TUBERCULEUX MORTS OU AVIRULENTS "TOXICITÉ" DU BACILLE AVIAIRE

par F. VAN DEINSE,

avec la collaboration de R. SCHWARTZ et J. SOLOMIDÈS.

Au cours des recherches que nous poursuivons depuis plusieurs années, concernant la prémunition des lapins au moyen de bacilles tuberculeux de type aviaire tués par chauffage, vis-à-vis d'une inoculation massive de bacilles aviaires vivants, nous avons observé certains cas de mort rapide, due à des réactions d'hyperergie, cas déjà décrits dans une note à la Société de Biologie (1) et que nous allons reproduire sommairement dans le présent travail.

Rappelons d'abord que l'inoculation par voie intraveineuse au lapin neuf d'une dose convenable (1 milligramme) d'une culture de bacilles tuberculeux de type aviaire fortement pathogène, est suivie d'une toxi-infection rapidement mortelle, dite du « type Yersin », d'après l'auteur qui a, le premier, étudié cette forme de tuberculose expérimentale (2). Elle fut étudiée ensuite par Straus et Gamaleia (3). Nous-même en avons repris l'étude avec notre regretté collaborateur M.-A. Domanski, et lui avons consacré un mémoire (4). Il résulte des différentes recherches sur la toxi-infection du type Yersin que, dans cette maladie à allure septicémique et dont l'issue est fatale, la mort ne survient jamais avant le douzième jour. On voit que l'inoculation intraveineuse d'une forte dose de bacilles aviaires vivants

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 202.
(2) Ces *Annales*, **2**, 1888, p. 245.
(3) *Arch. de Méd. Exp.*, **31**, 1891, p. 457.
(4) Ces *Annales*, **59**, 1937, p. 182.

au lapin est d'abord suivie d'une période d'incubation, pendant laquelle l'animal ne présente aucun signe anormal, et que c'est à partir du huitième jour seulement que le lapin commence à réagir par de la fièvre. Les animaux qui meurent le douzième jour, apparemment encore en pleine santé, semblent mourir plutôt par choc et l'on est tenté d'attribuer cette mort soudaine au développement de l'allergie, plus ou moins précoce selon l'animal, mais jamais suffisamment épanouie avant le douzième jour. A partir de ce moment, et d'après les dispositions individuelles de l'animal en question, celui-ci mourra ou bien par choc, ou bien se cachectisera sous l'influence des poisons bacillaires.

Tel est le tableau, sommairement esquissé, de la toxi-infection tuberculeuse du type Yersin, se produisant chez le lapin à la suite d'une inoculation intraveineuse d'une dose convenable de bacilles aviaires.

Or, voici maintenant brièvement exposé le protocole de l'expérience au cours de laquelle se sont produits les cas d'hyperergie et de mort rapide, auxquels nous venons de faire allusion dans les premières lignes de ce mémoire.

EXPÉRIENCE. — Sept lapins sont injectés par voie intramusculaire avec 1 milligramme de corps bacillaires aviaires tués par chauffage et séchés, émulsionnés dans 1 cent. cube d'un mélange de paraffines à point de fusion 45°. Quatre d'entre eux reçoivent, six mois plus tard, une injection intraveineuse de 2 milligrammes d'une culture aviaire (Tr. IX) vivante. Ces 4 lapins meurent respectivement en sept, sept, neuf et onze jours, présentant à l'autopsie les images caractéristiques d'une toxi-infection « Yersin ». Deux lapins témoins, inoculés le même jour, avec la même dose de la même culture, par voie veineuse, sont morts respectivement après quatorze et vingt-quatre jours d'une tuberculose « Yersin ». Les trois autres lapins ont été éprouvés à leur tour sept mois après l'inoculation paraffinée ; cette fois, par l'injection intraveineuse de 1/5 de milligramme de bacilles aviaires Tr. IX vivants. Deux de ces derniers meurent respectivement en six et huit jours d'une toxi-infection « Yersin », le troisième en dix-huit jours. Deux lapins témoins, inoculés le même jour avec 1/5 de milligramme de cette souche, sont morts respectivement après onze jours (pneumococcie), et vingt jours (« Yersin »).

Nous avons cru pouvoir expliquer ces morts rapides, avant le douzième jour, survenues chez la plupart des lapins traités au préalable par une injection de bacilles aviaires morts paraffinés (et que nous avons proposé d'appeler « toxi-infection type

Yersin en raccourci »), par le fait que les lapins en question étaient très fortement allergisés (comme l'avait bien montré Coulaud), qu'ils n'avaient donc pas besoin du délai de douze jours pour s'allergiser comme les lapins neufs et que, pour cette raison, la mort pouvait survenir chez eux bien avant le douzième jour. Il s'agissait, par conséquent, d'une hyperergie préexistante.

Des observations d'hyperergie expérimentale ont été consignées dans la littérature bien avant les nôtres. En 1891 déjà, J. Grancher et Ledoux-Lebard (5), étudiant les effets d'inoculations de doses croissantes de bacilles aviaires au lapin, notèrent que des phénomènes aigus peuvent survenir à la suite d'une de ces surinfections.

Straus et Gamaleia (6), en injectant à des lapins des doses pas trop fortes de bacilles tuberculeux de type humain, virent les animaux maigrir d'abord, puis reprendre leur poids primitif ; inoculés à ce moment par voie veineuse avec des bacilles vivants ou morts, les animaux mouraient généralement au bout de vingt-quatre heures.

De la même époque datent les expériences de J. Grancher et H. Martin (7). Ces auteurs ont vacciné des lapins par des injections intraveineuses de bacilles aviaires atténués par vieillissement. Un lapin meurt le lendemain de l'épreuve (injection intraveineuse de bacilles aviaires pleinement virulents) ; comme cause de la mort, les auteurs notent : « intoxication par la tuberculine ». Trois lapins meurent avant les témoins (« le traitement les mettait à l'abri du bacille, tout en les livrant à l'action nocive de la tuberculine », disent les auteurs dans leur commentaire). Un lapin meurt deux jours après la neuvième injection vaccinale, ayant une congestion intense de la rate, du foie et des poumons : les auteurs croient à une infection intercurrente, mais on verra plus loin la ressemblance de ce cas avec nos observations.

Voici maintenant quelques observations plus récentes :

Élise S. L'Espérance (8) a vu que des cobayes préparés par

(5) *Arch. de Méd. Exp.*, **3**, 1891, p. 145.
(6) *Arch. de Méd. Exp.*, **3**, 1891, p. 705.
(7) *Rev. de la Tuberc.*, **1**, 1893, p. 289.
(8) *J. of Immunol.*, **16**, 1929, p. 27.

des injections de bacilles humains ou bovins morts réagissent à une inoculation de bacilles aviaires vivants par des lésions beaucoup plus importantes que des cobayes neufs.

Un cas tout à fait comparable aux nôtres est rapporté par E. M. Medlar (9) : cet auteur a vacciné 4 lapins par voie sous-cutanée avec 5 milligrammes de bacilles tuberculeux de type humain (souche H-37). Les animaux reçurent, six mois plus tard, 1 milligramme de bacilles aviaires par voie veineuse. Trois de ces lapins sont morts de cent vingt-deux à cent quarante-neuf jours après l'épreuve, mais un seul est mort après sept jours, présentant une forte tuméfaction de la rate et du foie.

Des réactions hyperergiques furent également observées par R. Bieling et L. Oelrichs (10), quand ils ont surinfecté des lapins, vaccinés avec des bacilles humains morts, introduits par voie intratesticulaire, en leur inoculant 0 milligr 001 de bacilles bovins dans la veine. Trois animaux moururent respectivement en douze, quinze et dix-sept jours, ce qui, pour une si petite dose, constitue certainement une réaction hyperergique, comme le disent les auteurs ; d'ailleurs, les témoins sont morts bien plus tardivement.

Une expérience du même genre est rapportée par J. Freund et E. L. Opie (11), qui ont vu mourir 2 lapins, fortement allergisés par des injections répétées de bacilles de Koch morts, respectivement un et sept jours après une injection intraveineuse de bacilles morts.

Il est également possible de provoquer de ces réactions rapidement mortelles en infectant des cobayes allergiques par inhalation avec des bacilles tuberculeux virulents. C'est ce qu'ont fait K. A. Jensen et G. Bindslev (12). Leurs animaux ainsi traités meurent souvent en quelques jours, ou même le lendemain de l'épreuve virulente, d'une pneumonie tuberculeuse aiguë.

Mais c'est surtout dans une note de A. Boquet et

(9) *Amer. J. Pathol.*, 7, 1931, p. 475.
(10) *Beitr. z. Klin. d. Tbk.*, **90**, 1937, p. 491.
(11) *J. of Exp. Med.*, **68**, 1938, p. 273.
(12) *Acta Tuberc. Scand.* **11**., 1937, fasc. 2, p. 101.

W. Schaefer (13) qu'on trouve le plus de cas comparables aux nôtres. Nous les citerons ici brièvement.

Deux lapins reçoivent 1 milligramme de bacilles aviaires par voie sous-cutanée et, un mois plus tard, 0 milligr. 2 de la même culture dans la veine ; treize semaines après la première injection, ils sont éprouvés par une inoculation endoveineuse de 1 milligramme d'une culture aviaire : ils meurent respectivement en sept et dix jours. Deux autres lapins sont infectés, par voie sous-cutanée, avec 2 milligrammes de bacilles aviaires ; inoculation veineuse de 1 milligramme de la même culture six semaines plus tard : les deux animaux meurent en neuf jours. Sept lapins reçoivent 0 milligr. 00001 de bacilles bovins et sont éprouvés huit semaines plus tard par voie veineuse, avec 2 milligrammes de bacilles aviaires : 4 meurent après six, sept, neuf, dix jours. Quatre lapins, enfin, sont préparés par une injection intraveineuse de 1 milligramme de bacilles humains atténués et reçoivent, trente-six jours plus tard, 1 milligramme de bacilles aviaires. Deux d'entre eux meurent avant le douzième jour : l'un en huit jours, l'autre en neuf jours.

Nous nous bornons pour le moment à constater, en relisant cette énumération d'observations concernant des cas d'hyperergie expérimentale, que le bacille aviaire y est souvent en jeu.

L'étude expérimentale que nous avons entreprise comprend 8 groupes d'expériences, par lesquelles nous avons voulu essayer le pouvoir allergisant de bacilles aviaires et bovins morts et du BCG vivant vis-à-vis d'une infection d'épreuve sévère par des bacilles vivants, homologues ou non. Nous nous sommes servis de deux souches aviaires (Tr. XII et J.), bien pathogènes, et d'une souche bovine (H.-Sauton), très virulente. Les injections d'épreuve ont toujours eu lieu par voie veineuse, les injections préparantes également, à de rares exceptions près. Les 8 groupes d'expériences comprennent :

1° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par du BCG ;

(13) C. R. Soc. Biol., 117, 1938, p. 477.

2° Des lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par des bacilles bovins vivants ;

3° Des lapins préparés par des injections répétées de bacilles aviaires morts et éprouvés par des bacilles aviaires vivants ;

4° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 1 milligramme ;

5° Des lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de 0 milligr. 1 ;

6° Des lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de 5 milligrammes de BCG ;

7° Des lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de bacilles bovins vivants ;

8° Des lapins préparés par des injections de bacilles bovins morts et éprouvés par une injection de bacilles aviaires vivants.

Voici le détail de ces expériences :

Première expérience : *Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par du BCG.*

Huit lapins reçoivent tous les cinq jours une injection intraveineuse de 1 milligramme de BCG vivant. Deux meurent de maladies intercurrentes au cours du traitement. Six sont inoculés, également par voie veineuse, avec 5 milligrammes de BCG, onze jours après la septième injection préparante. Deux d'entre eux meurent respectivement d'une pasteurellose et d'une pneumococcie dans les deux semaines qui suivent l'épreuve ; les quatre autres survivent sans avoir présenté le moindre phénomène de choc.

Deuxième expérience : *Lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par des bacilles bovins vivants.*

Quatre lapins sont préparés par des injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles bovins morts tous les cinq jours. L'un meurt avant l'épreuve ; les trois autres sont éprouvés onze jours après la cinquième injection de bacilles morts par une injection de 1 milligramme du même bacille bovin vivant, par voie veineuse. Ils sont morts dans les délais habituels d'une granulie intense des poumons.

Troisième expérience : *Lapins préparés par des injections répétées de bacilles aviaires morts et éprouvés par des bacilles aviaires vivants.*

Cette série fait partie d'un travail antérieur (14). Sur 13 lapins préparés par une à trois injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture Tr. XII), éprouvés de cinq à trente-cinq jours après la première injection préparante par une inoculation endoveineuse de 0 milligr. 1 de la même culture aviaire vivante, trois

(14) *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 649.

sont morts respectivement en douze heures, en sept et en neuf jours ; les autres sont morts dans les délais habituels d'une tuberculose « Yersin », sauf trois qui ont survécu respectivement quarante-six, cinquante et un et soixante-huit jours. Les trois animaux morts d'une toxi-infection « Yersin en raccourci », présentèrent à l'autopsie des lésions caractérisées par des congestions intenses du foie et de la rate sans formations nodulaires.

Quatrième expérience : *Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de* 1 *milligramme.*

Quatre lapins reçoivent une seule injection sous-cutanée de 2 milligrammes de BCG, et quatre autres lapins sont inoculés tous les cinq jours avec 1 milligramme de BCG, dont trois fois par voie veineuse et deux fois sous la peau de la région inguinale. Ils sont éprouvés, deux mois après le début de cette vaccination, par une injection intraveineuse de 1 milligramme de bacilles aviaires (culture Tr. XII), en même temps que 2 lapins témoins. Ces derniers meurent le douzième jour, alors que, parmi les 8 lapins prémunis, 4 meurent respectivement en quatre, cinq, sept et neuf jours. Ils présentaient à l'autopsie une forte congestion de la rate et du foie, qui contenaient de très nombreux bacilles. C'est donc l'image du « Yersin en raccourci », une fois de plus.

Cinquième expérience : *Lapins préparés par des injections de BCG et éprouvés par des bacilles aviaires vivants à la dose de* 0 *milligr.* 1.

Huit lapins, divisés en deux lots de 4, sont préparés par le BCG, de la même manière que ceux de l'expérience précédente. Ils sont éprouvés, en même temps que 2 témoins, par une injection endo-veineuse de 0 milligr. 1 de la même culture aviaire Tr. XII. La dose d'épreuve fut donc dix fois inférieure à celle qui fut injectée dans la série précédente. Tous ces animaux sont morts d'une toxi-infection tuberculeuse « Yersin » dans les délais normaux, sauf un seul, parmi les vaccinés, qui est mort d'une granulie rénale et avec des lésions tuberculeuses osseuses deux mois et demi après l'épreuve. Les ensemencements ont donné dans ce cas une culture composée uniquement de colonies aviaires Par conséquent, aucun cas de toxi-infection « en raccourci » ne s'est produit dans cette série, à cause sans doute de la dose d'épreuve plus modérée.

Sixième expérience : *Lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de* 5 *milligrammes de BCG.*

Huit lapins reçoivent des injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture J.) tous les cinq jours. Deux meurent au cours du traitement d'infections intercurrentes. Six sont éprouvés dix-huit jours après la sixième injection de bacilles morts, par une inoculation endo-veineuse de 5 milligrammes de BCG vivant. Quatre lapins ainsi éprouvés sont morts dans les douze heures qui ont suivi l'injection de BCG. A l'autopsie et à l'examen histologique, on trouva chez tous les quatre de l'œdème hémorragique et de l'infiltration diffuse aux poumons ; le foie est décoloré et présente sur les coupes de la stase veineuse, des plaques hémorragiques, de l'infiltration diffuse et des cellules géantes disséminées. La rate est tuméfiée jusqu'à huit à

douze fois sa taille normale ; elle est hémorragique et présente des plages épithélioïdes et des cellules géantes. Dans les reins, on trouve de la nécrose granuleuse massive des tubes contournés. La formule leucocytaire, établie quatre heures après l'injection d'épreuve, avait montré des pourcentages extrêmement élevés de lymphocytes, jusqu'à 98 p. 100. Les rares granulocytes étaient dégénérés et il y avait absence totale de formes jeunes. Il existait donc une hypogranulocytose très prononcée. La série rouge était caractérisée par de l'anisocytose, de la poïkilocytose, de la polychromatophilie et de nombreux normoblastes. Tout ceci semble indiquer une intoxication grave de la moelle osseuse. Enfin, 2 de ces lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par du BCG ont survécu. Ils ont eu des pourcentages de polynucléaires basophiles dépassant 10 p. 100 dans les semaines qui ont suivi immédiatement l'épreuve, puis tout est rentré dans l'ordre. Bien entendu, rien d'anormal ne s'est produit chez 2 lapins témoins, inoculés avec 5 milligrammes de BCG en même temps que les lapins préparés. Les graves lésions trouvées chez les animaux morts de choc sont dues sans aucun doute à leur sensibilisation par les bacilles aviaires morts.

SEPTIÈME EXPÉRIENCE : *Lapins préparés par des bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de bacilles bovins vivants.*

Six lapins reçoivent tous les cinq jours une injection intra-veineuse de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (culture Tr. XII). Trois meurent d'infections intercurrentes au cours du traitement. Les trois autres sont éprouvés, onze jours après la cinquième injection de bacilles morts, par une inoculation endo-veineuse de 1 milligramme de bacilles bovins vivants. L'un meurt trois jours plus tard ; l'autopsie révèle, comme signes les plus saillants, une alvéolite et de l'œdème alvéolaire aux poumons et une infiltration diffuse abondante, à prédominance polynucléaire, du foie. On ne trouve pas de bacilles acido-résistants, ni aucun autre microbe. Les deux autres lapins meurent respectivement en vingt-cinq et vingt-six jours d'une granulie intense des poumons.

HUITIÈME EXPÉRIENCE : *Lapins préparés par des injections de bacilles bovins morts et éprouvés par une injection de bacilles aviaires vivants.*

Huit lapins reçoivent des injections répétées tous les cinq jours de 1 milligramme de bacilles bovins morts. Quatre meurent au cours du traitement d'autres maladies. Les 4 survivants sont éprouvés, onze jours après la cinquième injection de bacilles morts, par une inoculation de 1 milligramme de bacilles aviaires vivants (culture Tr. XII) par voie veineuse. L'un meurt dans les douze heures qui suivent l'épreuve, présentant à l'autopsie une congestion intense des organes, et à l'examen histologique une bronchi-alvéolite et des placards épithélioïdes aux poumons, une prolifération réticulaire et plasmodiale au foie et des nappes épithélioïdes dans la rate. Un deuxième meurt en huit jours, présentant des lésions analogues à celles du précédent. Un troisième meurt d'une pneumonie après deux mois, et le quatrième vit encore (15).

(15) Nous remercions M. BABLET, qui a bien voulu nous aider de ses conseils dans l'interprétation des coupes.

DISCUSSION.

Le premier fait qui se dégage de cette série d'expériences concerne le BCG : il semble évident que des lapins, traités par plusieurs injections intraveineuses de BCG, ne présentent aucune réaction d'hyperergie quand on leur inocule, également par voie veineuse, une dose massive de 5 milligrammes de BCG six à sept semaines après le début de la prémunition.

Mais il y a un autre fait à relever dans ces différentes expériences, c'est que des cas de réaction hyperergique, ce que nous avons appelé des toxi-infections Yersin « en raccourci », ou même des cas de choc (mort en moins de douze heures), se sont produits seulement dans celles de nos expériences où le bacille aviaire est intervenu soit à l'état mort, dans la préparation des animaux, soit vivant comme infection d'épreuve et à dose suffisante, donc dans les expériences 3, 4, 6, 7 et 8.

Nous répétons à ce propos ce que nous venons de dire plus haut : en relisant les observations d'hyperergie expérimentale que nous avons trouvées dans la littérature, on constate que le bacille aviaire y est souvent en jeu. Il en est donc de même dans nos expériences personnelles.

Ainsi, les lapins préparés par des injections répétées de bacilles bovins morts et éprouvés par l'inoculation de 1 milligramme de bacilles bovins vivants, n'ont pas eu de réactions d'hyperergie et sont morts, dans des délais normaux, de granulie pulmonaire. Il est possible que des doses d'épreuve plus fortes eussent déclenché une mort précoce chez quelques-uns de ces animaux ; nous avons voulu nous tenir dans les mêmes conditions pour le bacille bovin que pour le bacille aviaire et ne pas dépasser la dose de 1 milligramme. D'ailleurs, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, la souche bovine dont nous nous sommes servis est très virulente.

Dans ces conditions, il semble ressortir de nos expériences que certaines souches de bacilles aviaires sont douées d'une « toxicité » plus grande pour le lapin que certains bacilles bovins. Nous nous rendons compte que le mot « toxicité » est impropre à désigner l'action nocive dont il est question, puisqu'il ne saurait s'agir de la production d'une toxine dans

le cas du bacille tuberculeux comme dans celui du bacille de Loeffler par exemple. C'est pourquoi nous le mettons entre guillemets, faute de mieux.

Nous avons insisté, à différentes reprises, sur ce caractère « toxique » du bacille aviaire pour le lapin et nous avons cru pouvoir distinguer dans ce bacille deux facteurs de pathogénéicité : un facteur « virulence » proprement dite, et un facteur « toxicité ». En effet, quand on pratique l'autopsie d'un lapin mort d'une tuberculose du type Yersin à la suite de l'inoculation intraveineuse d'une dose suffisante de bacilles aviaires, on est frappé, dans la grande majorité des cas, par l'absence de lésions nodulaires visibles à l'œil nu et, sur les coupes, les nodules sont souvent rares et les lésions ont plutôt un caractère inflammatoire ou toxique banal. Nous avons attribué ces dernières lésions au facteur « toxique » agissant dans un organisme devenu allergique, et les lésions spécifiques nodulaires plus rares au facteur « virulence », en nous rendant compte, bien entendu, de tout ce que cette distinction pouvait avoir d'arbitraire et de schématique.

Rappelons à ce sujet les injections répétées de bacilles aviaires morts, auxquelles nous avons soumis des lapins (16) : les animaux ainsi traités sont sensibilisés à tel point que la dernière injection (souvent la huitième) déclenche la mort. Les lésions trouvées à l'autopsie ressemblent d'une manière frappante à celles qu'on note chez les lapins morts de tuberculose « Yersin ». Les lésions histologiques s'en distinguent par l'absence de formations folliculaires, mais le caractère congestif et hémorragique des lésions et les infiltrations intenses sont tout à fait comparables à ce qu'on trouve dans la toxi-infection « Yersin ».

Ce sont donc ces lésions non folliculaires, non spécifiques, causées par le bacille aviaire mort autant que par le bacille aviaire vivant, que nous croyons pouvoir attribuer au facteur « toxique » de ce bacille.

Or, en examinant les images histologiques sur les coupes provenant des lapins morts de tuberculose Yersin « en raccourci », dans les expériences relatées dans le présent mémoire,

(16) *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1933, p. 1063.

on retrouve ces mêmes lésions inflammatoires, ces infiltrations diffuses à polynucléaires, ces plages épithélioïdes parsemées de cellules géantes, et même ces dégénérescences des tubes contournés dans le rein dans certains cas, que nous avions déjà notées chez des lapins morts de tuberculose Yersin à bacilles aviaires vivants, ou morts à la suite d'injections répétées de bacilles aviaires morts.

Nous rappelons la fréquence relative d'une augmentation du pourcentage des polynucléaires basophiles que nous avons trouvée, avec J. Solomidès, chez des lapins inoculés avec des bacilles aviaires, soit directement, soit après un traitement préalable par des bacilles aviaires morts (17). Nous avons rapproché cette basophilie de celle qu'on peut provoquer artificiellement chez le lapin par des intoxications expérimentales (Levaditi, Pröscher, Nicolau). On est tenté d'y voir, par conséquent, un signe de plus de la « toxicité » des bacilles aviaires.

L'hypogranulocytose extrême et les images « toxiques » de la série rouge du sang chez les lapins de l'expérience n° 6 plaident également en faveur d'un véritable empoisonnement, comme le font d'ailleurs les nécroses granulaires des tubes contournés des reins chez ces mêmes lapins.

On sait, d'autre part, qu'il existe des arthropathies chez le lapin, causées par le bacille aviaire (18). Or, ces animaux n'hébergent plus de bacilles, la plupart du temps, que dans les abcès qui entourent les articulations malades. Néanmoins, ils finissent par mourir cachectiques. On a l'impression que les bacilles, pourtant cantonnés dans quelques foyers seulement, loin des organes vitaux, réussissent à empoisonner l'organisme tout entier.

Comment s'expliquer cette action nocive du bacille aviaire quand, d'autre part, la tuberculine, produite dans les cultures de ce germe sur milieux liquides, est justement douée de qualités réactionnelles assez médiocres ?

Nous croyons que Straus et Gamaleia ont touché le nœud du problème en disant que « ce n'est pas dans le milieu de culture où ce bacille a végété que l'on retrouve les principaux

(17) *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 828.

(18) Voir la littérature sur ce sujet, in *Rev. de la Tuberc.*, **5**, février 1939, p. 242.

produits toxiques qu'il élabore. Ces substances sont fixées et retenues dans le corps même du bacille. » (19).

A. Calmette décrit, lui aussi, les substances toxiques, « intimement liées au protoplasma » des bacilles tuberculeux (20).

On sait que seules les fractions protéiques des bacilles tuberculeux suffisamment complexes sont allergisantes et toxiques pour l'animal neuf. Les fractions par trop dénaturées par les manipulations physico-chimiques ne sont plus toxiques pour l'animal sain, et beaucoup moins toxiques pour l'animal tuberculeux. C'est ainsi que la tuberculine est trop dénaturée pour être antigène (21).

Il est donc possible que les corps bacillaires, dans le cas de certaines cultures aviaires, soient plus « toxiques » que ceux du bacille de type bovin, tout en produisant dans les cultures une tuberculine plus dénaturée et, partant, moins active que celle des autres types bacillaires.

Conclusion.

Nous pensons que certaines cultures de bacilles tuberculeux du type aviaire ont un pouvoir « toxique » plus prononcé que des cultures de bacilles des mammifères, malgré la moindre activité de leur tuberculine, et nous tenons le lapin allergisé pour particulièrement sensible aux poisons que constituent les protéines des corps bacillaires aviaires.

Quant au BCG, il nous a été impossible de provoquer un état de choc ou d'hyperergie mortels chez des lapins traités par des injections répétées de BCG et éprouvés quelque temps après par une injection intraveineuse massive de ce même germe.

(19) *Arch. de Méd. Exp.*, 3, 1891, p. 705.

(20) *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*, 4e éd., 1936, p. 199.

(21) J. Albert-Weil. *Les poisons du bacille tuberculeux*, etc., Paris, 1931.

INFLUENCE DES CAROTÉNOÏDES SUR LA CROISSANCE ET L'ACIDO-RÉSISTANCE DES BACILLES PARATUBERCULEUX DE LA FLÉOLE

par E. DARZINS.

(*Institut d'Hygiène de l'Université de Riga, Lettonie.*
Directeur : Professeur E. FEHRMANN.)

I. — ANALOGIE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES TERPÈNES ET DES CAROTÉNOÏDES.

Dans des recherches précédentes (1), nous avons démontré que l'huile de pin exerce *in vitro* et *in vivo* une action d'inhibition sur la croissance des bacilles tuberculeux et paratuberculeux. L'examen comparé de plusieurs dérivés de l'huile de pin a révélé que l'effet de cette substance sur les bactéries dépend de sa teneur en terpinéol, qui en constitue de 60 à 90 p. 100, et en composés encore mal définis, dont le taux dans l'huile de pin lettone atteint 25 p. 100. Enfin, l'étude parallèle de différents terpènes a mis en évidence que l'action du terpinéol sur les bacilles tuberculeux est nettement en relation avec la présence d'un noyau avec liaison double dans la molécule.

Or, Willstätter et Mieg ont déjà signalé la similitude de la structure chimique des terpènes et des caroténoïdes. Actuellement, les terpènes, ainsi que les caroténoïdes, sont considérés comme des produits de polymérisation de l'isoprène. En tenant compte de cette analogie de leur structure chimique, nous avons supposé qu'il existe une analogie dans l'action biologique de ces deux groupes de substances. En conséquence, nous avons examiné l'effet des caroténoïdes sur la croissance de bacilles acido-résistants.

(1) DARZINS (E.). Ces *Annales*, **61**, **1938**, p. 172.

II. — Pigments du bacille de la fléole et du jaune d'œuf. Leur effet sur la croissance du bacille de la fléole.

A. Boquet a étudié les conditions optima de la formation de ces substances par le bacille de Grassberger en fonction de la température. Chargaff et Lederer, Ingraham et Steenbock et d'autres auteurs ont mis en évidence la présence des caroténoïdes dans les bacilles acido-résistants. D'après Chargaff, le β-carotène constitue la partie principale du pigment dans le bacille de la fléole. Cependant, le rôle de ce pigment dans le métabolisme bactérien est inconnu. On a supposé que les caroténoïdes jouent un rôle dans la fonction respiratoire de bactéries, comme la pyocyanine, dont la fonction a été étudiée par Michaelis et Friedheim.

Le pigment jaune rougeâtre du bacille de la fléole est inclus dans les corps mêmes des germes. Il se forme dans les cultures à la température du laboratoire, tandis qu'à la température de 37° à l'étuve, les cultures sont incolores. La présence d'huile d'olive dans le milieu de culture favorise la formation du pigment par le bacille de la fléole, tandis que les vapeurs d'huile de pin empêchent cette formation. Il est possible d'isoler le pigment par l'extraction de bacilles avec l'alcool, le chloroforme et les huiles (huile de vaseline, huile de pin, etc.).

Nous avons envisagé l'action d'un autre pigment sur les cultures de bacilles acido-résistants, notamment du pigment du jaune d'œuf, qui constitue la partie essentielle de certains milieux nutritifs, tels que les milieux de Dorset, de Petroff, de Besredka et de Lœwenstein. Il nous a paru intéressant, avant d'étudier l'action du pigment propre de bacilles acido-résistants, d'examiner l'influence d'un pigment caroténoïde sur la croissance et l'acido-résistance de ces bacilles, ainsi que sur la formation de leur propre pigment. Pour isoler le pigment de l'œuf, nous avons traité le jaune d'œuf par l'acétone, ce qui nous a permis d'obtenir, après évaporation, une substance huileuse renfermant les caroténoïdes (xanthophylle).

Nous avons ajouté cet extrait, à raison de 0,01 p. 100, à de la gélose glycérinée. Ce milieu présente à peu près le même

pH que la gélose sans extrait. Cependant, les cultures du bacille de la fléole obtenues sur la gélose additionnée de l'extrait du jaune d'œuf sont moins abondantes que les cultures sur le même milieu sans extrait. Cet extrait exerce donc une certaine action d'inhibition sur la croissance du bacille de la fléole.

III. — Méthode d'examen de l'acido-résistance.

Dans nos expériences préliminaires, nous avons constaté que, pour étudier comparativement l'acido-résistance de germes sur divers milieux, il faut comparer les zones correspondantes des colonies développées sur ces milieux, car, dans chaque colonie, la zone centrale est plus riche que la zone périphérique en germes acido-résistants. Pour cette raison, les cultures diffuses sur les milieux solides ne peuvent pas servir pour étudier les caractères tinctoriaux des germes. Afin d'éviter les variations dues à la technique, nous avons préparé sur la même lamelle les frottis d'une culture sur le milieu examiné et les frottis d'une culture témoin sur le milieu ordinaire, ce qui permet de colorer les deux frottis exactement avec la même technique.

Les frottis des colonies obtenues sur le milieu renfermant de l'huile furent immergés dans un bain de benzène (cinq minutes) avant la coloration.

Les frottis sur la lamelle furent colorés par la fuchsine de Ziehl à 60° pendant une minute. Les frottis colorés furent immergés dans un bain de sulfite de soude à 1 p. 100 pour obtenir une décoloration régulière

En opérant dans ces conditions, nous avons pu constater que les cultures du bacille de la fléole sur gélose glycérinée et additionnée d'extrait de jaune d'œuf se montrent intensément colorées en rouge, même quarante-huit heures après l'application du traitement décolorant, tandis que les germes développés sur la gélose glycérinée pure sont entièrement décolorés par le même procédé.

IV. — Influence du carotène cristallisé sur la croissance et l'acido-résistance de bactéries.

Pour élucider le rôle du pigment contenu dans l'extrait de jaune d'œuf, nous avons étudié l'influence du carotène cristallisé (β-carotène cristallisé Hoffmann-La Roche) sur les cultures du bacille de la fléole et du bacille tuberculeux. Le carotène fut dissous dans de l'huile de vaseline ou dans de l'huile d'olive, ou encore agité dans de l'eau et stérilisé par chauffage trois jours successifs à 75°, pendant trente minutes. La gélose glycérinée, additionnée d'une certaine dose de carotène, fut placée dans des tubes (gélose inclinée) ou des boîtes de Petri, puis ensemencée abondamment en certains points. Nous avons constaté que l'ensemencement du bacille de la fléole sur 10 c. c. de gélose additionnée de 0 gr. 002 de carotène ne donne presque aucune végétation, tandis que l'ensemencement analogue sur le même milieu sans carotène aboutit à une croissance abondante. Ces résultats montrent nettement que le carotène ajouté au milieu nutritif exerce une action d'inhibition sur la croissance du bacille de la fléole.

En examinant comparativement par les méthodes ci-dessus décrites l'acido-résistance, nous avons trouvé que les germes obtenus sur le milieu avec carotène conservent leur coloration même après quatre-vingt-seize heures de traitement par une solution à 1 p. 100 de sulfite de soude, tandis que les germes cultivés sur les milieux témoins (sans carotène) sont complètement décolorés dans la même solution après vingt-quatre heures.

Étant donné cette augmentation de l'acido-résistance par le carotène, il apparaît donc, *a priori*, que, dans les cultures du bacille de la fléole sur le milieu ordinaire à la température du laboratoire, fortement pigmentées (réaction nettement positive de Carr-Price pour les substances caroténoïdes), les germes doivent être plus acido-résistants que dans les cultures à 37°, qui sont relativement pauvres en pigment (réaction de Carr-Price négative ou douteuse) Cette supposition est confirmée par l'expérience : en effet, dans les cultures du bacille de la fléole obtenues à la température du laboratoire, les germes

colorés par la méthode de Ziehl restent colorés après le traitement pendant vingt-quatre heures par le sulfite de soude, tandis que le même traitement décolore les mêmes germes provenant de cultures à 37°.

Le raisonnement inverse impose, *a priori*, une autre supposition : il est probable que le traitement des cultures du bacille de la fléole par une méthode déterminant la diminution de leur teneur en pigment ou la disparition totale de celui-ci contribue également à diminuer ou à faire disparaître leur acido-résistance. En effet, déjà Isabolinski et Gitowitsch ont signalé que, dans les cultures du bacille tuberculeux sur gélose glycérinée, placée sous une couche d'huile d'olive, les germes perdent graduellement leur acido-résistance. Contrairement à l'avis de ces auteurs, l'action de l'huile n'est pas spécifique, car des résultats analogues sont obtenus avec l'huile de vaseline. Dans nos recherches personnelles, nous avons observé que déjà après trois passages dans les cultures sous huile de vaseline, les bacilles de la fléole perdent leur pigment et leur acido-résistance et que les cultures changent également d'aspect : celles-ci ne forment plus une masse sèche et pigmentée, mais une membrane transparente semblable à une culture de *B. coli*. Les bacilles de cette culture colorés par la méthode de Ziehl sont décolorés par le sulfite de soude en dix minutes, c'est-à-dire aussi rapidement que le *B. coli* ou le *B. subtilis*. Cette modification du bacille de la fléole produite dans les cultures sous l'huile est facilement réversible. En effet, après quelques passages sur gélose sans huile, les cultures anormales récupèrent leur pigment et leur acido-résistance.

V. — Mécanisme d'action du carotène sur les bactéries acido-résistantes.

Pour interpréter l'effet du carotène sur la croissance et l'acido-résistance des bacilles, nous avons d'abord tenu compte de la coloration jaune intense des colonies du bacille de la fléole, cultivé à 37° sur des milieux avec carotène (les témoins cultivés à 37° sur des milieux sans carotène sont incolores). Nous avons supposé que cette coloration des colonies et l'augmentation de l'acido-résistance des bacilles développés sur

les milieux riches en carotène seraient dues à une combinaison chimique entre le carotène et les graisses ou les acides gras du bacille. Cependant, cette hypothèse ne fut pas confirmée par nos expériences : le carotène additionné à différentes températures aux graisses et aux acides gras, saturés ou non saturés, n'a pas changé l'acido-résistance de ces substances. De même, l'addition de carotène n'a pas augmenté l'acido-résistance des produits extraits du bacille de la fléole par l'éther de pétrole. Ces résultats négatifs nous permettent de supposer que le carotène agit seulement dans la cellule vivante pour produire l'accumulation de substances acido-résistantes et entraver la croissance des germes : les bacilles morts immergés dans la solution de carotène n'augmentent pas l'acido-résistance.

Comme nous l'avons démontré (2), l'augmentation de l'acido-résistance des bacilles paratuberculeux est due à l'élévation du point de fusion de leurs substances grasses Cette élévation entraîne une plus grande résistance de ces bacilles contre la chaleur, acides et alcalis dilués.

Conclusions.

1° Les substances caroténoïdes et le carotène cristallisé entravent la végétation du bacille de la fléole.

2° Les bacilles de la fléole développés sur la gélose glycérinée additionnée de carotène se montrent plus acido-résistants que les bacilles provenant d'une culture sur la gélose sans carotène.

3° L'accroissement de la teneur des bactéries en carotène détermine une augmentation de leur acido-résistance, et, réciproquement, la disparition progressive de leur pigment entraîne l'atténuation progressive de leur acido-résistance.

4° L'augmentation de l'acido-résistance des bacilles paratuberculeux est due à l'élévation du point de fusion de leurs substances grasses. Cette augmentation confère à ces bacilles une résistance plus grande contre la chaleur, les acides et les alcalis dilués.

(2) Darzins (E.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p 743

5° Le carotène n'est pas un constituant indispensable à la vie des bacilles acido-résistants.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Boquet (A.). Article Bacilles paratuberculeux in *Traité de Bactériologie*, publié par Nattan-Larrier.
[2] Darzins (E.). Ces *Annales*, **61**, 1938, p. 172.
[3] Darzins (E.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 743.
[4] Chargaff (E.) et Lederer (E.). Ces *Annales*, **54**, 1935, p. 393.
[5] Ingraham (M. A.) et Steenbock (H.). *Biochem. Journ.*, **29**, 1935, p. 2553.
[6] Isabolinsky (M.) et Gitowitsch (W.). *Zeits. f. Immun.*, **40**, 1924, p. 303.
[7] Mac Junkin (F. A.). *Amer. Rev. Tubercul.*, **9**, 1924, p. 464.
[8] Willstatter (R.) et Mieg (W.). *Liebig's Ann.*, **19**, 1907, p. 355.

ACTION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DU B. DE SHIGA SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM FRAIS NORMAL DE LAPIN

par P. THIBAULT.

(*Institut Pasteur. Service de M. le docteur* DUMAS.)

On sait que le polysaccharide spécifique d'un type de pneumocoque, ajouté dans des mélanges de sérum et de leucocytes, s'oppose spécifiquement à la phagocytose des pneumocoques du même type.

Ce fait a été établi par Sia [**1**], et confirmé par H. K. Ward [**2**] qui a montré, en outre, que l'action inhibitrice du polysaccharide peut être neutralisée par un immun-sérum. Mais cet immun-sérum doit être convenablement dilué : si la quantité d'anticorps est trop faible; l'action inhibitrice n'est pas neutralisée ; si la quantité d'anticorps est trop forte, la phagocytose ne se produit pas non plus. Ward attribue ce phénomène paradoxal à l'action, « peut-être mécanique », du précipité spécifique sur les leucocytes.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre une étude comparable avec un microbe tel que le B. dysentérique de Shiga, dont la sensibilité, bien connue, au sérum frais normal, permet de mettre hors de cause le rôle des leucocytes dans les phénomènes observés.

De ce bacille, comme de nombreux autres microbes qui ne restent pas colorés après la méthode de Gram, A. Boivin et ses collaborateurs [**3**] ont pu extraire un complexe glucido-lipidique spécifique. Ce complexe a, non seulement, comme un haptène, la propriété de donner, *in vitro*, des réactions immunologiques, mais il se comporte aussi comme un antigène : son injection à l'animal provoque la formation d'anticorps O dont Félix et Olitzki [**4**] ont montré l'importance dans la bactériolyse.

C'est avec l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga que nous avons recherché et étudié l'inhibition du pouvoir bactéricide du sang et du sérum frais normal de lapin.

I. — Technique.

La technique suivie pour ces expériences est inspirée de celle de H. K Ward [2].

SANG. — Le sang est recueilli stérilement par ponction cardiaque de lapins neufs. Il est défibriné doucement, dans un ballon contenant des perles de verre, et utilisé le jour même, ou, exceptionnellement, conservé à la glacière jusqu'au lendemain. Le sérum est obtenu en centrifugeant le sang défibriné ou en laissant le sang coaguler dans des godets et en centrifugeant au moment de l'emploi.

ANTIGÈNE. — Trois préparations d'antigène glucido-lipidique sont utilisées pour ces expériences. Elles ont été obtenues de souches lisses de B. de Shiga, en suivant la technique de A. Boivin, à l'acide trichloracétique. M. A. Boivin a bien voulu les titrer pondéralement. Elles sont rendues isotoniques par addition d'eau salée.

SOUCHES DE B. DE SHIGA. — Les souches de B. de Shiga sont trois souches lisses : Sh. 18 S, Sh. 33 S, Sh. Bucarest S ; trois souches rugueuses : Sh. 18 R, Sh. 30 R, Sh. Bucarest R. Nous classons les souches 18, 33, 30 dans les variantes S ou R d'après leurs propriétés antigéniques. Les souches Bucarest nous ont été confiées par M. A. Boivin : seule la souche S contient un antigène complet glucido-lipidique. Au cours des expériences, la stabilité des variantes est vérifiée grâce à la réaction de Millon [5].

SUSPENSIONS MICROBIENNES. — Les suspensions microbiennes sont faites dans du bouillon dilué au 1/20 avec de l'eau physiologique [6]. Au moment de l'emploi, on émulsionne dans 10 cent cubes la totalité des bacilles développés en dix-huit

heures à 37° sur une gélose inclinée ; on dilue cette suspension au 1/10, au 1/100, au 1/1.000, etc..., jusqu'au 1/10.000.000.

Pour démontrer les germes vivants, I goutte de chacune des trois suspensions microbiennes les plus faibles est mélangée à de la gélose liquéfiée et ramenée à 45-50°. Les géloses solidifiées restent pendant quarante-huit heures à l'étuve. Les colonies sont alors comptées : les chiffres donnés dans les expériences représentent la moyenne des nombres fournis par ces trois numérations.

Disposition de l'expérience. — De petits tubes (diamètre : 1 centimètre, hauteur : 9 centimètres), rangés par séries de 8 reçoivent : 1° une quantité fixe (0 c. c. 5 en général) de sang normal défibriné ou de sérum frais de lapin ; 2° sous un volume aussi petit que possible, les substances dont l'action sur le pouvoir bactéricide est étudiée ; 3° I goutte de chacune des suspensions microbiennes. Le premier tube, par exemple, reçoit : 6 bacilles, le deuxième : 60, etc...., le huitième : 60 millions.

On scelle et on porte à l'étuve. La température est de 35°.

Pour assurer un meilleur contact des différents constituants du mélange, les tubes sont soumis pendant le séjour à l'étuve à une rotation lente. Pour cela, nous utilisons un appareil construit sur les indications de notre collègue G. Hornus (1). Une boîte tournant autour d'un axe est reliée à un petit moteur électrique par l'intermédiaire d'un réducteur de vitesse. Les tubes sont couchés et alignés dans la boîte, leur grand axe perpendiculaire à l'axe de rotation, puis ils sont calés avec du coton.

Résultats. — L'action bactéricide s'exerce rapidement, puis les bacilles qui n'ont pas été détruits se multiplient. Le lendemain, chaque tube est ouvert, une anse du contenu est prélevée et étalée à la surface d'un tube de gélose inclinée. Les géloses sont placées à l'étuve et les résultats lus après vingt-quatre heures. Dans les tableaux, nous exprimons par les signes :

(1) Nous remercions M. G. Hornus d'avoir amicalement mis cet appareil à notre disposition.

+ + +, une culture à colonies confluentes ;

+ +, une culture moins abondante avec des colonies isolées ;

+, quelques colonies facilement numérables. Ce signe est habituellement suivi d'un chiffre qui indique le nombre des colonies ;

—, pas de culture.

II — Action de l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga sur le pouvoir bactéricide du sérum normal pour le B. de Shiga.

A. Pouvoir bactéricide du sang défibriné et du sérum frais normal de lapin pour le B. de Shiga. — Nous devons, avant toute autre expérience, étudier rapidement le pouvoir bactéricide normal du sang défibriné et du sérum frais de lapin pour le B. de Shiga.

Nous recueillons séparément le sang défibriné et le sérum frais de 4 lapins normaux, de l'un ou l'autre sexe, choisis, à dessein, d'âge et de poids différents ; nous préparons 8 séries de petits tubes, soit 2 séries par lapin. Les tubes de la première contiennent chacun 0 c. c. 5 de sang défibriné ; ceux de la deuxième, 0 c. c. 5 de sérum frais. Chaque tube de même sang est ensemencé avec I goutte de la même émulsion de B. de Shiga S. Les tubes n° 1 reçoivent 5 bacilles, les tubes n° 2 en reçoivent 50, etc... Les résultats sont notés dans le tableau I.

Le sang des lapins possède un pouvoir bactéricide élevé pour le B. de Shiga. Une moyenne, portant sur une vingtaine d'expériences, montre que 0 c. c. 5 de sang peut détruire 75.000 bacilles. L'amplitude des variations individuelles est très modérée. De même, l'action du sérum est assez constante. On remarque qu'elle est nettement supérieure à celle du sang. Un semblable phénomène a déjà été observé par Mackie, Finkelstein et Van Rooyen (1932) [7] pour les b. dysentériques ainsi que par Fiessinger et Cattan (1928) [8] pour le b. typhique. Sans doute est-il dû à l'action protectrice pour les microbes que peuvent exercer les phagocytes (Rous et Jones, 1916) [9].

Le pouvoir bactéricide du sérum disparaît par chauffage

TABLEAU I. — **Pouvoir bactéricide du sang défibriné et du sérum frais pour le B. de Shiga.**

NUMÉROS DES TUBES	NOMBRE DE B. DE SHIGA (souche 18/7)	SÉRIES 1	2	3	4	5	6	7	8
		Lapin A		Lapin B		Lapin C		Lapin D	
		Sang : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sang : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sang : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sang : 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5
1	5	—	—	—	—	—	—	—	—
2	50	—	—	—	—	—	—	—	—
3	100	—	—	—	—	—	—	—	—
4	3.000	—	—	—	—	—	—	—	—
5	50 000	—	—	+ 8	—	—	—	—	—
6	500 000	+ 30	—	+ +	—	+ +	—	+ +	—
7	5 000 000	+ + +	+ + +	+ + +	—	+ + +	—	+ + +	+ 4
8	50.000.000	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Lapin A, femelle, 3.650 grammes, lapin B, male, 2.400 grammes, lapin C, mâle, 1.900 grammes, lapin D, male, 1.650 grammes.

à 56° pendant trente minutes mais reparaît après adjonction d'une faible quantité de sérum frais. La quantité de sérum frais nécessaire pour réactiver 0 c. c. 5 de sérum chauffé est de l'ordre de 0 c. c. 05 à 0 c. c. 1.

En résumé : normalement, le sang défibriné et le sérum frais de lapin sont bactéricides pour le B. de Shiga. Cette propriété est indépendante de l'action des éléments figurés puisque le sérum possède un pouvoir semblable et même supérieur à celui du sang.

La destruction de l'alexine entraîne la disparition de l'action bactéricide du sérum, mais cette propriété reparaît dans le sérum chauffé après l'adjonction d'une faible quantité de sérum frais.

B. INHIBITION, PAR L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DU B. DE SHIGA, DU POUVOIR BACTÉRICIDE DU SANG ET DU SÉRUM FRAIS POUR LE B. DE SHIGA. — Lorsqu'on ajoute à du sang défibriné de

lapin normal une certaine quantité d'antigène glucido-lipidique, extrait d'une souche lisse de B. de Shiga, on diminue le pouvoir bactéricide de ce sang pour une souche lisse de B. de Shiga.

Par exemple (tableau II) 1/2 cent. cube de sang détruit 80 000 B. de Shiga mais, si l'on a ajouté avant l'ensemencement 0 milligr. 004 d'antigène, il ne détruit plus que 800 bacilles ; si l'on a ajouté 0 milligr. 016, il devient incapable de détruire même 8 bacilles.

TABLEAU II. — **Action de l'antigène glucido-lipidique sur le pouvoir bactéricide du sang et du sérum frais.**

NOMBRE DE B. DE SHIGA (souche 1[illegible])	SÉRIES						SÉRIES				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Sang défibriné frais 0 c.c. 5						Sérum frais 0 c.c. 5				
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga										
	0	0 milligr. 033	0 milligr. 016	0 milligr. 008	0 milligr. 004	0 milligr. 002	0	0 milligr. 066	0 milligr. 033	0 milligr. 016	0 milligr. 008
8	—	+++	+++	—	—	—	—	++	++	—	—
80	—	+++	+++	—	—	—	—	+++	++	—	—
800	—	+++	+++	++	—	—	—	+++	++	++	—
8 000	—	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	++	—
80.000	—	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	+ 14
800.000	+ 3	+++	+++	+++	++	++	—	+++	+++	+++	+++
8.000.000	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
80.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube 0 c.c. 6.

Avec le sérum, on obtient, de même, l'inhibition complète du pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga mais, à volume égal, il faut davantage d'antigène : 0 milligr. 033 dans cette expérience. La quantité de complexe glucido-lipidique nécessaire pour produire l'inhibition semble en rapport avec la quantité de sérum.

C. Quantité d'antigène nécessaire pour produire l'inhibition. — Recherchons maintenant si la quantité d'antigène nécessaire pour produire l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum est variable suivant les individus de la même espèce.

Pour cela, nous prélevons 10 cent. cubes de sang à 4 lapins. Avec le sérum de chacun d'eux nous préparons une série de 7 tubes qui reçoivent une quantité fixe de sérum (0 c. c. 5), une dose variable d'antigène et une quantité fixe et minime de bacilles de Shiga vivants (80 bacilles environ) [tableau III].

Tableau III. — **Quantité d'antigène glucido-lipidique nécessaire pour provoquer l'inhibition.**

Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	Séries			
	1	2	3	4
	Sérum frais 0 c.c. 5			
	Lapin 39	Lapin 40	Lapin 41	Lapin 42
	B. de Shiga 188 Numération 80 bacilles			
0	—	—	—	—
0,00625	—	—	—	—
0,0125	—	—	—	—
0,025	—	+ 5	—	—
0,05	++	++	—	+ 4
0,1	++	+++	+++	++
0,2	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube . 0 c.c. 7.

Après séjour des tubes à l'étuve, nous portons sur gélose une anse de leur contenu.

Simultanément, suivant la technique déjà exposée, nous titrons le pouvoir bactéricide (tableau III *bis*).

Un demi cent. cube de sérum détruit, suivant les lapins, de 800.000 à 8.000.000 de bacilles de Shiga. La quantité d'antigène qui permet la culture de 80 bacilles provoque donc une inhibition quasi complète du pouvoir bactéricide. La quantité nécessaire pour produire cet effet varie ici, suivant les animaux, entre 0 milligr. 025 et 0 milligr. 1. En réalité, les varia-

TABLEAU III *bis*.

NOMBRE de B. de Shiga 18 S	POUVOIR BACTÉRICIDE DES SÉRUMS			
	39	40	41	42
	Sérum : 0 c.c. 5	Sérum 0 c.c. 5	Sérum 0 c.c. 5	Sérum 0 c.c. 5
80.000 . . .	—	—	—	—
800 000 . .	—	—	—	—
8.000.000 . .	—	+ 1	—	+ 4
80.000 000 . . .	+++	+++	+++	+++

tions individuelles sont plus importantes que ne le fait supposer cette expérience.

Non seulement la quantité d'antigène nécessaire est variable d'un lapin à l'autre, mais encore elle varie dans le temps pour le même individu. Saignons, en effet, les mêmes animaux quinze jours plus tard et faisons une expérience aussi semblable que possible à la précédente (tableaux IV et IV *bis*).

Pour 2 lapins, la quantité de complexe glucido-lipidique

TABLEAU IV. — **Quantité d'antigène glucido-lipidique nécessaire pour provoquer l'inhibition.**

QUANTITÉ d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	SÉRIES			
	1	2	3	4
	Sérum frais : 0 c.c. 5			
	Lapin 39	Lapin 40	Lapin 41	Lapin 42
	B. de Shiga : 18 S Numération : 60 bacilles			
0	—	—	—	—
0,00625 . . .	—	—	+++	—
0,0125 . . .	—	—	+++	—
0,025	—	—	+++	—
0,05	—	—	+++	—
0,1	—	—	+++	—
0,2	+ 6	—	+++	—
Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.				

TABLEAU IV *bis*.

NOMBRE de B. de Shiga 188	POUVOIR BACTÉRICIDE DES SÉRUMS			
	39	40	41	42
	Sérum . 0 c.c. 5	Sérum : 0 c.c. 5	Sérum . 0 c.c. 5	Sérum . 0 c.c. 5
60.000	—	—	—	—
600.000 . . .	—	+ 3	+ 1	—
6.000.000 . . .	++	+ 3	++	++
60.000 000 . . .	+++	+++	+++	+++

nécessaire pour neutraliser l'effet bactéricide de 0 c. c. 5 de sérum est supérieure à 0 milligr. 2 ; pour le lapin n° 41, elle est inférieure à 0 milligr. 00625 : quantité exceptionnellement faible

Il ne semble pas que la répétition de la saignée soit à incriminer puisque la dose nécessaire d'antigène augmente pour 3 lapins et diminue pour le quatrième.

Enfin, l'intensité du pouvoir bactéricide et la quantité du complexe susceptible de le neutraliser ne paraissent pas en rapport étroit : leurs variations ne sont pas forcément parallèles. Par exemple, le sérum du lapin n° 40 manifeste sensiblement la même activité dans les deux expériences, bien que la quantité d'antigène nécessaire pour produire l'inhibition ait augmenté de 0 milligr. 025 à plus de 0 milligr. 2.

D. LA TENEUR EN ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DE DIVERSES SOUCHES DE B. DE SHIGA MODIFIE-T-ELLE LEUR SENSIBILITÉ AU SÉRUM ? — Puisque le complexe glucido-lipidique produit une inhibition du pouvoir bactéricide du sérum, il serait raisonnable de penser que les diverses souches de B. de Shiga sont plus ou moins sensibles selon leur teneur en antigène.

A. Boivin et L. Mesrobeanu ont montré que les variantes « S » fournissent seules ce complexe et que les variantes « R » en sont dépourvues [10]. Bordet et Renaux [11] ont déjà observé une plus grande sensibilité à l'alexine de la variante R du *B. coli* Mackie et Finkelstein [12] ont fait une remarque

identique pour le B. typhique mais n'ont pas trouvé de différence entre les deux variantes du B. de Shiga.

Dans les expériences que nous rapportons, les bacilles de Shiga, qu'ils appartiennent à des souches S ou à des souches R, présentent à peu près la même sensibilité au pouvoir bactéricide du sérum normal.

TABLEAU V. — **Pouvoir bactéricide du sérum frais pour les bacilles de Shiga S ou R.**

SÉRIES							
1		2		3		4	
Sérum normal frais : 0 c.c. 5							
B. de Shiga 18 S		B. de Shiga 18 R		B. de Shiga Bucarest S		B. de Shiga Bucarest R	
Numération :		Numération :		Numération :		Numération :	
4	—	5	—	6	—	4	—
40	—	50	—	60	—	40	—
400	—	500	—	600	—	400	—
4.000	—	5.000	—	6.000	—	4.000	—
40.000	—	50.000	—	60.000	—	40.000	—
400.000	+ 4	500.000	—	600.000	—	400.000	—
4.000.000	++	5.000.000	++	6.000.000	—	4.000.000	—
40.000.000	+++	50.000.000	+++	60.000.000	+++	40.000.000	++

Nous sommes obligé de faire quelques réserves sur l'exactitude de la numération pour les souches R. On sait que les bactéries de cette variante s'agglutinent spontanément en présence d'électrolytes et que plusieurs microbes agglutinés peuvent donner naissance à une seule colonie. Il ne semble pas cependant que cette propriété apporte un trouble considérable aux expériences. En effet, en émulsionnant dans des quantités égales d'excipient les bacilles développés pendant un même temps, sur des géloses inclinées ayant sensiblement la même surface, on obtient des suspensions pour lesquelles les numérations fournissent des chiffres très rapprochés.

E. L'ACTION DU COMPLEXE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM NORMAL EST-ELLE DUE A SA FRACTION HAPTÈNE ? — Sia (1926) [1], puis Ward (1930) [2] ont montré

que, dans un mélange sérum-leucocytes et dans le sang humain défibriné, le polysaccharide spécifique du pneumocoque inhibe la phagocytose de ce microbe.

En chauffant le complexe glucido-lipidique en milieu acétique, on obtient le polysaccharide libre, dépourvu de toxicité et de pouvoir antigène mais précipitable spécifiquement par un immun-sérum [**13**]. A. Boivin a bien voulu se charger d'effectuer ce clivage sur un échantillon de la préparation d'antigène en ramenant la solution au volume initial.

Nous avons pratiqué simultanément le titrage du pouvoir bactéricide d'un même sérum normal après adjonction :

1° Soit d'eau physiologique ;

2° Soit de doses variables de la préparation d'antigène ;

3° Soit de doses variables de la solution de polysaccharide, ces doses étant volumétriquement égales à celles de la préparation d'antigène.

Le tableau VI montre que 1/50 de centimètre cube de la suspension d'antigène inhibe complètement l'effet bactéricide du sérum normal pour le B de Shiga ; 1/200 de centimètre cube produit déjà une diminution notable de cet effet. Au contraire, la solution de polysaccharide se montre absolument inactive, même à la dose de 1/10 de centimètre cube.

Plusieurs expériences semblables ont donné des résultats analogues ; le polysaccharide semble dénué d'activité vis-à-vis du sérum normal. Nous devons observer cependant que la solution haptène, en présence d'un immun-sérum, précipite à un taux notablement plus faible que la préparation originale d'antigène. Il est possible que la totalité du polysaccharide spécifique ne se retrouve pas dans la solution obtenue par clivage et qu'une concentration supérieure à celle que nous avons employée soit susceptible de produire l'inhibition.

En résumé : l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga inhibe le pouvoir bactéricide du sang défibriné et du sérum frais normal de lapin pour le B. de Shiga.

La quantité d'antigène nécessaire pour produire cette inhibition est variable d'un animal à l'autre et variable dans le temps pour un même animal. Elle n'est pas en rapport étroit avec le pouvoir bactéricide du sérum.

TABLEAU VI. — Action comparée de l'antigène glucido-lipidique et du polysaccharide libre.

NOMBRE DE B. DE SHIGA	SÉRIES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Sang défibriné frais : 0 c.c. 5								
	Préparation d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga					Solution de polysaccharide libre			
	0	1/10 de centimètre cube	1/50 de centimètre cube	1/200 de centimètre cube	1/800 de centimètre cube	1/10 de centimètre cube	1/50 de centimètre cube	1/200 de centimètre cube	1/800 de centimètre cube
4	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—
40	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—
400	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—
4 000	—	+++	+++	++	—	—	—	—	—
40 000	—	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
400.000	+ 15	+++	+++	+++	+ 1	+ 2	++	++	+ 20
4 000 000	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
40.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 6.

La résistance de diverses souches de B. de Shiga à l'action du sérum normal n'est pas en fonction de leur teneur en antigène glucido-lipidique. Les souches S et R de ce bacille ont une résistance à peu près égale.

L'action inhibitrice exercée par le complexe glucido-lipidique ne semble pas due à sa fraction haptène : à volume égal, une solution de polysaccharide libre, obtenue par clivage du complexe ne provoque aucune diminution du pouvoir bactéricide, tandis que la suspension d'antigène complet produit une inhibition totale.

III — Spécificité de l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum normal par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga.

A. Action de l'antigène glucido-lipidique sur le pouvoir bactéricide du sérum pour des bacilles d'espèce différente. — Nous venons de voir que l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga inhibe la propriété bactéricide du sérum normal de lapin pour ce microbe. Nous allons rechercher si cette inhibition est spécifique ou si elle s'étend à d'autres bacilles : bacilles dysentériques du type Flexner ou Hiss, B. typhique, B. paratyphique A. Toutes les souches utilisées sont lisses.

Tableau VII. — **Spécificité de l'inhibition.**

B. de Shiga 18S	Séries			B. de Flexner	Séries		B. de Hiss	Séries	
	1	2	3		4	5		6	7
Nombre de B. de Shiga	Sérum normal frais 0 c.c. 5			Nombre de B. de Flexner	Sérum normal frais : 0 c.c. 5		Nombre de B. de Hiss	Sérum normal frais : 0 c.c. 5	
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme				Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	
	0	0,2	0,02		0	0,2		0	0,2
9	—	—	—	10	—	—	12	—	—
90	—	++	—	100	—	—	120	—	—
900	—	++	—	1.000	—	—	1.200	—	—
9 000	—	++	—	10 000	—	—	12.000	—	—
90.000	—	+++	++	100.000	++	++	120.000	—	—
900 000	—	+++	+++	1.000.000	+++	+++	1.200.000	—	—
9.000 000	+ 2	+++	+++	10.000.000	+++	+++	12.000.000	++	+ 3
90.000 000	+++	+++	+++	100.000.000	+++	+++	120.000.000	+++	+++

Volume total dans chaque tube . 0 c.c. 7.

Chaque expérience comporte trois séries témoins dont les tubes reçoivent des bacilles de Shiga. La première montre que le sérum utilisé possède un pouvoir bactéricide élevé pour ce bacille : 1/2 cent. cube détruit 900.000 (tableau VII) ou

TABLEAU VIII. — **Spécificité de l'inhibition.**

B DE SHIGA 188	SÉRIES			B. TYPHIQUE	SÉRIES		B. PARATYPHIQUE A	SÉRIES	
	1	2	3		4	5		6	7
	Sérum normal frais . 0 c.c. 5				Sérum normal frais : 0 c.c. 5			Sérum normal frais 0 c.c. 5	
Nombre de B. de Shiga	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			Nombre de B. typhiques	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme		Nombre de B. paratyphiques A	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme	
	0	0.2	0,02		0	0,2		0	0,2
6	—	+++	—	6	—	—	12	—	—
60	—	+++	+ 20	60	—	—	120	—	—
600	—	+++	++	600	—	—	1.200	—	—
6.000	—	+++	+++	6.000	—	—	12.000	—	—
60.000	—	+++	+++	60.000	—	—	120.000	—	—
600.000	—	+++	+++	600.000	+ 2	++	1.200 000	—	—
6 000.000	—	+++	+++	6.000.000	+++	+++	12.000 000	++	++
60.000.000	+++	+++	+++	60 000.000	+++	+++	120.000 000	+++	+++

Volume total dans chaque tube . 0 c.c. 7.

6.000.000 de bacilles (tableau VIII) ; la deuxième, que 0 milligr. 2 d'antigène diminue fortement ou supprime complètement ce pouvoir ; la troisième, qu'une dose dix fois moindre d'antigène produit encore une inhibition sensible.

Dans les séries suivantes, comprenant des bacilles d'espèces diverses, le pouvoir bactéricide du sérum pour les bacilles de Flexner ou de Hiss, le B. typhique, le B. paratyphique A n'est pas modifié par l'adjonction de 0 milligr. 2 du complexe glucido-lipidique du B. de Shiga. Nous devons signaler toutefois que, dans les expériences avec le bacille typhique les résultats sont un peu moins réguliers qu'avec les autres microbes : par exemple un sérum dont 1/2 cent. cube détruit 700.000 bacilles typhiques peut, en présence du complexe, n'en détruire que 70 000 Cependant, les différences sont minimes : l'action du complexe glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique.

B. ACTION DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM POUR LE B. DE SHIGA R. — La variante

rugueuse du B. de Shiga diffère essentiellement de la variante lisse par l'absence de l'antigène O spécifique [**14**]. Cependant, si l'on ajoute à du sérum frais, en même temps que des bacilles R, cet antigène O, sous forme du complexe glucido-lipidique, les bacilles ne retrouvent pas les caractéristiques originales des souches lisses et leur sensibilité n'est pas modifiée (tableau IX).

TABLEAU IX. — **Spécificité de l'inhibition.**

B DE SHIGA Bucarest S	SÉRIES 1	SÉRIES 2	SÉRIES 3	B DE SHIGA Bucarest R	SÉRIES 4	SÉRIES 5	SÉRIES 6
	Sérum normal frais . 0 c.c. 5				Sérum normal frais 0 c.c. 5		
Nombre de B. de Shiga S	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			Nombre de B. de Shiga R	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme		
	0	0,2	0,02		0	0,2	0,02
6	—	+	—	5	—	—	—
60	—	++	—	50	—	—	—
600	—	+++	+	500	—	—	—
6 000	—	+++	++	5 000	—	—	—
60 000	—	+++	+++	50 000	—	—	—
600 000	—	+++	+++	500 000	—	—	—
6 000 000	—	+++	+++	5.000 000	—	—	—
60 000 000	+++	+++	+++	50.000 000	++	++	++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

Une dose de 0 milligr. 2 d'antigène, qui inhibe complètement le pouvoir bactéricide de 0 c. c. 5 de sérum frais pour les bacilles de Shiga S, est absolument sans effet pour les bacilles de Shiga R. Ceux-ci sont détruits par le sérum comme des bacilles d'espèce différente.

En résumé : l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum frais normal par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique. L'effet bactéricide du sérum est conservé pour les B. de Flexner et de Hiss, le B. typhique et le B. paratyphique A. Il reste intact pour les B. de Shiga de la variante R qui se comportent comme des bacilles d'espèce différente.

IV. — Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique.

La spécificité de l'inhibition du pouvoir bactéricide du sérum frais par l'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga pourrait n'être qu'une apparence due à quelque substance favorisant spécifiquement la culture de ce bacille [15]. Cette hypothèse devra être écartée s'il est possible de neutraliser l'action de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique.

Mais avant d'étudier cette neutralisation nous devons voir rapidement l'effet de ce sérum expérimental lui-même sur le pouvoir bactéricide normal.

A. Action du sérum anti-antigène glucido-lipidique sur le pouvoir bactéricide d'un sérum normal. — Neisser et Wechsberg (1901) [16] ont montré qu'un excès d'anticorps empêche l'action bactéricide. Buxton (1904-1905) [17] a trouvé qu'un immun-sérum antityphique frais n'a pas d'action sur le B typhique, mais conserve les propriétés bactéricides d'un sérum normal sur le vibrion du choléra. Thjotta (1920) [18] a étudié le phénomène de Neisser-Wechsberg en utilisant un sérum anti-B. de Shiga. Nous avons nous-même constaté avec plusieurs sérums frais anti-B de Shiga S, obtenus par injections intraveineuses de suspensions bacillaires, une inhibition du pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga S avec conservation de l'activité sur le B. de Hiss et le B. de Shiga R.

En ajoutant, en quantité variable, du sérum de lapin anti-antigène glucido-lipidique à une quantité fixe de sang frais défibriné ou à du sérum frais, nous observons là encore une inhibition plus ou moins marquée du pouvoir bactéricide, dans les séries de tubes contenant une quantité élevée d'anticorps. Le pouvoir bactéricide reste normal pour les bacilles de Flexner, le B. paratyphique A, le B. de Shiga R.

Quelle que soit la dilution du sérum anti-antigène glucido-lipidique, le pouvoir bactéricide ne paraît jamais nettement supérieur à celui du sérum normal.

B. Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique. — Pour rechercher la neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène par un sérum anti-antigène glucido-lipidique, du sang de lapin, fraîchement défibriné, est réparti dans plusieurs séries de 8 tubes (tableau X) La première série, qui ne reçoit que des bacilles

Tableau X. — **Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène glucido-lipidique (sang).**

NOMBRE de B. de Shiga S	SERIES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Sang défibriné 0 c.c. 5							
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme							
	0	0,018	0.018	0,018	0.018	0.018	0,018	0.018
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube							
	0	0	1/ 0	1/40	1/160	1/640	1/2.500	1/10.000
8	—	+++	++	—	—	—	—	+++
80	—	+++	+++	—	—	—	—	+++
800	—	+++	+++	++	-	—	—	+++
8.000	—	+++	+++	++	—	—	+++	+++
80.000	—	+++	+++	++	+ 20	+ 25	+++	+++
800.000	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
8.000 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
80.000.000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		PROZONE			ZONE		POSTZONE	
Volume total dans chaque tube 0 c.c. 7.								

de Shiga, indiquera le pouvoir bactéricide du sang. Dans tous les autres tubes, nous ajoutons, avant ensemencement une quantité fixe d'antigène (0 milligr. 018) suffisante pour produire l'inhibition spécifique. La deuxième série montrera si cette inhibition est obtenue. Enfin, dans tous les autres tubes, nous distribuons sous un volume de 0 c. c. 1 des doses, variables et décroissantes pour chaque série, du sérum immum : dans les tubes de la troisième série : 0 c. c. 1 de sérum pur, dans les tubes de la quatrième : 0 c. c. 1 de sérum dilué

au 1/4, etc... Dans l'une de ces séries, l'antigène doit se trouver à peu près exactement neutralisé.

Le sang est capable de détruire 80.000 bacilles de Shiga. L'adjonction de 0 milligr. 018 d'antigène produit une inhibition totale du pouvoir bactéricide. Une forte quantité d'immun-sérum, 1/10 de centimètre cube, n'empêche pas cette inhibition. Cependant, 1/160 ou 1/640 de centimètre cube d'immun-sérum ramène sensiblement le pouvoir bactéricide à sa puissance normale. Une dilution plus forte ne neutralise plus l'antigène et 1/10.000 de centimètre cube laisse reparaître une inhibition totale.

Il existe donc une dose de sérum anti-antigène glucido-lipidique susceptible de neutraliser l'action inhibitrice qu'exerce l'antigène sur le pouvoir bactéricide du sang normal défibriné, mais la neutralisation ne se produit que dans une « zone » assez étroite, limitée d'une part par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « postzone » où les anticorps sont insuffisants.

Ward [2] a observé un phénomène semblable en neutralisant par un immun-sérum l'action inhibitrice du polysaccharide du pneumocoque sur la phagocytose de ce microbe. Il a pensé que la « prozone » était due à l'action du précipité sur les leucocytes.

Dans ces expériences avec le B. de Shiga, sensible à l'action du sérum, sans intervention des cellules, une semblable explication ne peut être acceptée. D'ailleurs on obtient des résultats analogues en utilisant du sérum frais au lieu de sang défibriné (tableau XI).

Un demi cent. cube de sérum détruit 800.000 B. de Shiga ; 0 milligr. 036 d'antigène inhibe complètement ce pouvoir bactéricide puisque 8 bacilles cultivent abondamment. Si l'on ajoute 1/5 de centimètre cube de sérum anti-antigène l'inhibition est à peine modifiée (culture de 80 bacilles). Au contraire, une dose de 1/80 à 1/320 de sérum ramène le pouvoir bactéricide à sa normale. Puis, pour des dilutions plus fortes, les anticorps deviennent insuffisants et l'inhibition est à nouveau totale.

TABLEAU XI. — **Neutralisation de l'action inhibitrice de l'antigène glucido-lipidique (sérum).**

NOMBRE de B. de Shiga S	SÉRIES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Sérum frais normal . 0 c.c. 5							
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme							
	0	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube							
	0	0	1/5	1/20	1/80	1/320	1/1.250	1/5.000
8	—	++	—	—	—	—	—	— 4
80	—	+++	++	—	—	—	—	++
800	—	+++	+++	+ 10	—	—	—	+ 12
8 000	—	+++	+++	+ 2	—	—	—	++
80 000	—	+++	+++	+++	—	—	—	+++
800 000	—	+++	+++	+++	—	—	+++	+++
8.000 000	+ 5	+++	+++	++	+ 2	—	++	+++
80 000 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		PROZONE			ZONE		POSTZONE	

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 8.

C. MÉCANISME DE L'INHIBITION DU POUVOIR BACTÉRICIDE DANS LA PROZONE. — L'inhibition du pouvoir bactéricide du sang ou du sérum dans la prozone, causée par la présence simultanée d'antigène glucido-lipidique et de son immun-sérum en excès, ne paraît pas relever du même mécanisme que l'inhibition spécifique produite par l'un ou l'autre de ces facteurs (tableau XII).

Le pouvoir bactéricide de 1/2 cent. cube de sang défibriné qui détruit 60.000 bacilles de Shiga est légèrement diminué pour ce microbe par l'adjonction de 0 c. c. 1 de sérum anti-antigène homologue. Il est complètement inhibé par 0 milligr. 018 d'antigène et aussi par la présence simultanée de ces deux facteurs. Si nous préparons en même temps une expérience identique mais avec des B. de Flexner au lieu de B. de Shiga, on voit que ni le sérum anti-antigène, ni l'antigène du B de Shiga ne modifie le pouvoir bactéricide du sang défibriné

TABLEAU XII. — **Inhibition non spécifique dans la « prozone » (sang).**

B. DE SHIGA 18S	SÉRIES 1	SÉRIES 2	SÉRIES 3	SÉRIES 4	B. DE FLEXNER	SÉRIES 5	SÉRIES 6	SÉRIES 7	SÉRIES 8
	Sang défibriné : 0 c.c. 5					Sang défibriné : 0 c.c. 5			
Nombre de B. de Shiga	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme				Nombre de B. de Flexner	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			
	0	0	0,018	0,018		0	0	0,018	0,018
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube					Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube			
	0	0,1	0	0,1		0	0,1	0	0,1
6	—	—	++	—	7	—	—	—	++
60	—	—	++	+++	70	—	—	—	+++
600	—	—	+++	+++	700	—	—	—	+++
6 000	—	—	+++	+++	7 000	—	—	—	+++
60 000	—	++	+++	+++	70.000	+++	+++	++	+++
600 000	++	+++	+++	+++	700.000	+++	+++	+++	+++
6 000.000	++	+++	+++	+++	7.000.000	±++	+++	+++	+++
60.000 000	+++	+++	+++	+++	70.000.000	+++	+++	+++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 7.

pour le B. de Flexner : dans les séries 6 et 7, comme dans la cinquième, le sang détruit 7.000 de ces bacilles. Au contraire, dans la huitième série, qui contient simultanément l'antigène du B. de Shiga et son immun-sérum : 7 bacilles de Flexner fournissent une culture abondante.

Une expérience semblable peut être réalisée avec du sérum frais au lieu de sang défibriné. Elle donne des résultats identiques en utilisant au lieu du B. de Flexner le B. paratyphique A (tableau XIII).

Dans l'expérience que nous relatons, on peut remarquer que l'inhibition du pouvoir bactéricide est plus fortement marquée pour le B. paratyphique A que pour le B. de Shiga.

Notons qu'au cours de plusieurs essais nous n'avons pas pu obtenir d'inhibition pour le B. de Shiga R.

Le pouvoir bactéricide du sérum frais est donc inhibé d'une façon spécifique par l'antigène glucido-lipidique du B. de

TABLEAU XIII. — **Inhibition non spécifique dans la « prozone » (sérum).**

B. DE SHIGA 18 S	SÉRIES 1	2	3	4	B. PARA-TYPHIQUE A	SÉRIES 5	6	7	8
Nombre de B. de Shiga	Sérum normal frais 0 c.c. 5				Nombre de B. paratyphiques A	Sérum normal frais : 0 c.c. 5			
	Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme					Quantité d'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga en milligramme			
	0	0	0,044	0.044		0	0	0,044	0,044
	Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube					Quantité de sérum anti-antigène glucido-lipidique en centimètre cube			
	0	0,02	0	0,2		0	0,02	0	0,02
13	—	—	—	—	16	—	—	—	—
130	—	—	—	—	160	—	—	—	+++
1.300	—	—	++	+ 8	1 600	—	—	—	+++
13.000	—	—	+	+ 13	16.000	—	—	—	+++
130.000	—	—	+++	+++	160.000	—	—	—	+++
1.300.000	—	+ 8	+++	+++	1.600.000	—	—	—	+++
13.000.000	+ 15	+++	+++	+++	16.000.000	—	—	—	+++
130.000.000	+++	+++	+++	+++	160.000.000	+++	+ 11	++	+++

Volume total dans chaque tube : 0 c.c. 8.

Shiga, et, d'une façon non spécifique, par l'antigène et son immun-sérum en excès.

D. L'INHIBITION DU POUVOIR BACTÉRICIDE EST-ELLE DUE A LA FIXATION DE L'ALEXINE ? — La fixation de l'alexine expliquerait de façon simple ce phénomène, mais l'alexine est-elle fixée ?

Mettons dans 3 tubes : soit du sérum frais normal, soit du sérum frais et de l'antigène, soit du sérum frais, de l'antigène et un excès de sérum anti-antigène glucido-lipidique. Les volumes sont égalisés par addition d'eau physiologique. Nous laissons les tubes à 37° pendant une heure et demie, puis, après avoir réparti le contenu de chacun d'eux, nous titrons son pouvoir bactéricide pour le B. de Shiga, suivant la technique habituelle. Ce pouvoir est conservé dans la série qui contient le sérum normal ; il est disparu dans les séries qui

contiennent soit le sérum et l'antigène, soit le sérum, l'antigène et l'immun-sérum.

L'alexine, cependant, titrée en présence de globules rouges de mouton sensibilisés, est seulement diminuée de moitié pour l'un et l'autre de ces mélanges, par rapport au sérum témoin. Cette diminution ne peut expliquer l'inhibition du pouvoir bactéricide.

En résumé, il existe une dose de sérum anti-antigène glucido-lipidique susceptible de neutraliser l'action inhibitrice spécifique qu'exerce l'antigène du B. de Shiga sur le pouvoir bactéricide du sérum frais normal.

La neutralisation se produit seulement dans une « zone », assez étroite, limitée d'une part par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « post-zone » où les anticorps sont insuffisants.

L'inhibition du pouvoir bactéricide dans la « prozone » due à la présence simultanée d'antigène et d'un excès d'anticorps correspondant, n'est pas spécifique. Cette inhibition n'est pas due à la fixation de l'alexine.

Conclusions.

1° L'antigène glucido-lipidique du B. de Shiga S inhibe le pouvoir bactéricide du sang défibriné ou du sérum frais de lapin pour le B. de Shiga S.

2° La quantité d'antigène nécessaire pour produire cette inhibition est variable d'un animal à l'autre et variable dans le temps pour un même animal. Elle ne semble pas être en rapport étroit avec le pouvoir bactéricide.

3° Une solution de polysaccharide libre obtenue par clivage du complexe glucido-lipidique et employée en quantité volumétriquement égale à celle de la préparation d'antigène complet ne provoque pas l'inhibition du pouvoir bactéricide.

4° Les variantes R du B. de Shiga, quoiqu'elles ne contiennent pas l'antigène glucido-lipidique, peuvent montrer une résistance à l'action bactéricide du sérum sensiblement égale à celle des souches S.

5° L'inhibition du pouvoir bactéricide par le complexe glucido-lipidique du B. de Shiga est spécifique. L'activité du sérum

normal est conservée vis-à-vis des B. dysentériques de Flexner ou de Hiss et des B. typhique ou paratyphique A.

6° Elle n'est pas modifiée non plus pour les B. de Shiga de la variante R. Ces bacilles, au cours de l'expérience, n'ont pas présenté de retour à la forme S.

7° L'action inhibitrice spécifique de l'antigène peut être neutralisée par une quantité convenable de sérum anti-antigène glucido-lipidique mais dans une « zone » assez étroite limitée par une « prozone » où il y a excès d'anticorps et une « postzone » où les anticorps sont insuffisants. Le phénomène s'observe aussi bien en présence de sérum frais que de sang défibriné.

8° L'inhibition du pouvoir bactéricide dans la « prozone » n'est pas spécifique. Elle se manifeste pour le B. de Flexner ou le B. paratyphique A aussi bien que pour le B. de Shiga. Cette inhibition n'est pas due à la fixation de l'alexine.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Sia (R. H. P.). *J. Exp. Med.*, **43**, 1926, p. 633.
[2] Ward (H. K.). *J. Exp. Med.*, **51**, 1930, p. 675 et p. 685.
[3] Boivin (A.), Mesrobeanu (L.) et Mesrobeanu (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 307. — Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). *Rev. Immunol.*, **1**, 1935, p. 553 ; **2**, 1936, p. 113 ; **3**, 1937, p. 319 ; **4**, 1938, p. 40, 197, 469.
[4] Félix (A.) et Olitzki (L.). *J. Imm.*, **11**, 1926, p. 31.
[5] White (P. B.). *J. Path. a. Bact.*, **32**, 1929, p. 85. — Thibault (P.) et Braunberger (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 434.
[6] Nicolle (M.), Jouan (C.) et Debains (E.). Ces *Annales*, **33**, 1919, p. 318.
[7] Mackie (T. J.), Finkelstein (M. H.) et Van Rooyen (C. E.). *J. Hyg.*, **32**, 1932, p. 494.
[8] Fiessinger (N.) et Cattan (R.). *La Presse Médicale*, 1928, p. 1185.
[9] Rous (P.) et Jones (F. S.). *J. Exp. Med.*, **23**, 1916, p. 601.
[10] Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). *Rev. Immunol.*, **2**, 1936, p. 113.
[11] Bordet (J.) et Renaux (E.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 539.
[12] Mackie (T. J.) et Finkelstein (M. H.). *J. Hyg.*, **32**, 1932, p. 1.
[13] Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). *Rev. Immunol.*, **1**, 1935, p. 553.
[14] Arkwright (J. A.). *J. Path. a. Bact.*, **24**, 1921, p. 36. — White (P. B.). *Med. Res. Council Spec. Rep.*, n° 103, 1926. — Thibault (P.) et Braunberger (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 617.
[15] Gordon (J.) et Hoyle (L.). *J. Path. a. Bact.*, **43**, 1936, p. 545.
[16] Neisser (M.) et Wechsberg (F.). *Münch. med. Woch.*, **48**, 1901, p. 697.
[17] Buxton (B. H.). *J. Med. Res.*, **13**, 1904-1905, p. 305, 431, 461.
[18] Thjotta (Th.). *J. Imm.*, **5**, 1920, p. 1.

RECHERCHES SUR QUELQUES BASES SYNTHÉTIQUES ANTAGONISTES DE L'HISTAMINE (*)

par ANNE-MARIE STAUB.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie thérapeutique.*)

DEUXIÈME PARTIE

LÉGITIMITÉ DE LA NOTION D'ANTIHISTAMINIQUE

Dans la première partie de ce travail nous avons montré que l'action antitoxique constatée sur le choc histaminique du cobaye s'étend à toutes les manifestations de l'histamine sur les muscles lisses ; elle mérite bien de ce fait le nom d'antihistaminique.

Toutefois, l'histamine n'est pas le seul excitant des fibres lisses : l'acétylcholine, le chlorure de barium agissent dans le même sens qu'elle. A ces excitants s'opposent déjà des antagonistes connus : parasympatholytiques et spasmolytiques. Pouvons-nous adopter comme nouvelle et spécifique la notion d'antihistaminique ou devons-nous rattacher nos produits à l'un de ces groupes ?

Parasympatholytiques ? La réponse nous sera donnée par la comparaison des principaux antihistaminiques (929 F et 1571 F) avec l'atropine.

Spasmolytiques ? la réponse nous sera fournie par la comparaison avec la papavérine ou un spasmolytique de synthèse récemment étudié par Halpern [41] sous le nom de « Propavine » : l'Ester propyléthylacétique du diéthylaminoéthanol :

$$\begin{matrix} C_3H_7 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!>\! CHCOOCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$$

(*) Voir Ces *Annales*, **63**, 1939, p. 400.

A. — Intestin de cobaye.

C'est à l'intestin de cobaye que nous nous sommes adressée tout d'abord. On sait que sur cet organe l'acétylcholine provoque régulièrement une contraction unique, brève ou durable, suivant les intestins, tout à fait comparable à celle obtenue avec l'histamine. Les doses actives correspondent exactement à celles de ce poison : 0 milligr. 01 (4) de l'un comme de l'autre produisant la contraction maximum de l'anse intestinale. Quant au chlorure de barium, il manifeste une action très inconstante. Dans la majorité des cas, 20 milligrammes provoquent une élévation tonique moyenne suivie de nombreuses contractions plus ou moins accentuées ; toutefois, cette dose peut ne provoquer que des mouvements péristaltiques sans élever le tonus musculaire ; elle peut aussi provoquer une très forte contraction. Du moins sur une même anse l'action reste-t-elle constante.

1° Action des antihistaminiques 929 F et 1571 F. — Nous avons donc recherché l'action du 929 F et du 1571 F sur les trois contractions provoquées par 0 milligr. 01 d'histamine, 0 milligr. 01 d'acétylcholine et 20 milligrammes de $BaCl_2$. Après 0 milligr. 1 de l'un ou de l'autre antihistaminique tout intestin est inexcitable par l'histamine. Que deviennent alors les actions des deux autres excitants?

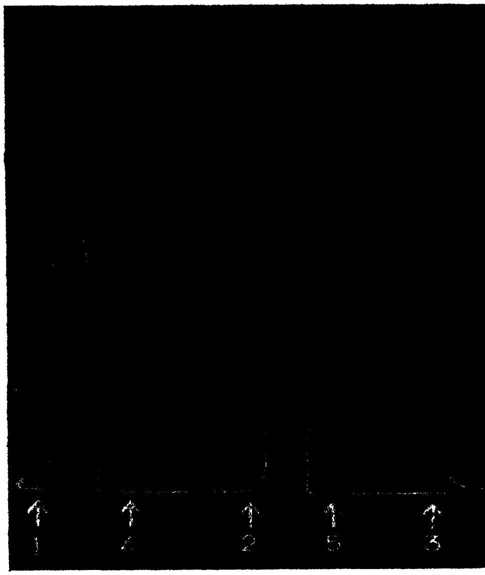
Après 929 F, la réponse à l'acétylcholine est plus ou moins complètement supprimée ; la réponse au $BaCl_2$ est très fortement diminuée.

Après 1571 F, les réponses à l'acétylcholine et au $BaCl_2$ ne sont que faiblement ou pas du tout diminuées.

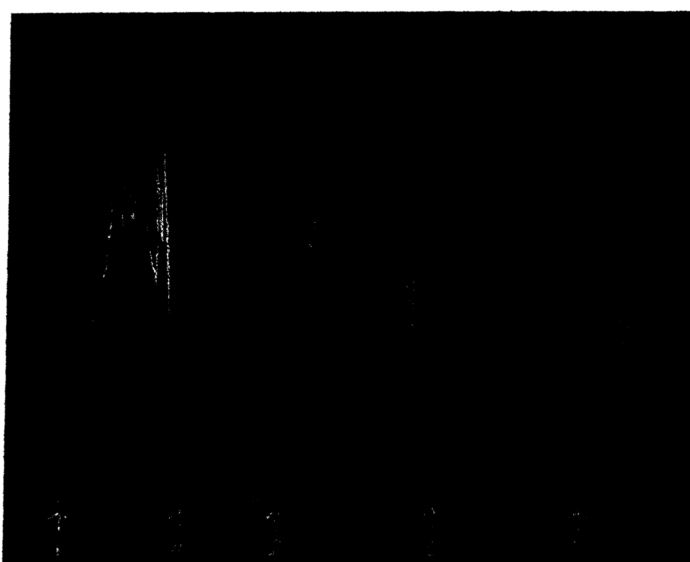
Dans tous les cas, sur un même intestin, les réponses aux deux excitants, après 1571 F, sont toujours beaucoup plus fortes qu'après 929 F.

2° Action des spasmolytiques. — La papavérine et la « Propavine », essayées contre l'histamine, se sont révélées actives

(4) Toutes les doses sont données dans 100 cent. cubes d'un bain d'une solution de Tyrode-Webster.



A

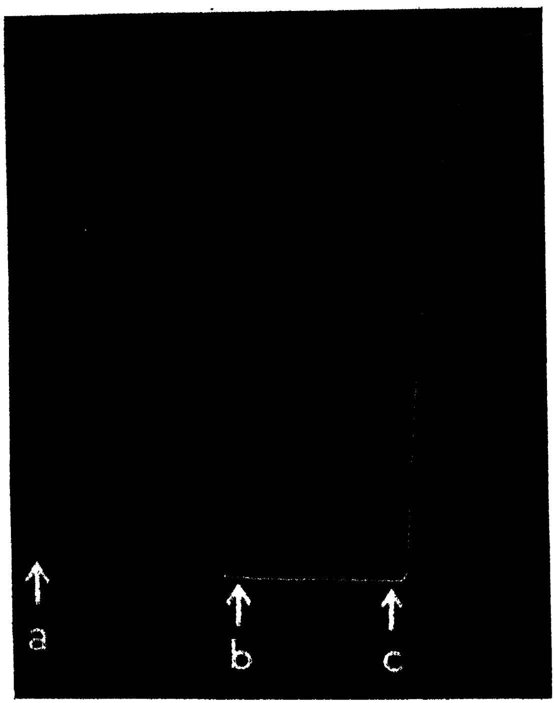


B

GRAPHIQUE IX. — Intestin de cobaye isolé, bain de 100 cent. cubes. A, Action de 0 milligr. 01 d'acétylcholine (1, 2, 3) dans la solution de Tyrode-Webster pure et après 0 milligr. 1 de 1571 F (4) ou de 929 F (5); B, action de 20 milligrammes de $BaCl_2$ (1, 2, 3) dans la solution de Tyrode-Webster pure et après 0 milligr. 1 de 1571 F (4) ou de 929 F (5).

à des doses semblables, voisines de 2 milligrammes, soit environ 20 à 40 fois supérieures à celles obtenues avec le 929 F et le 1571 F.

3° ACTION DES PARASYMPATHOLYTIQUES : ATROPINE. — L'atropine supprime l'action de l'histamine aux mêmes doses que

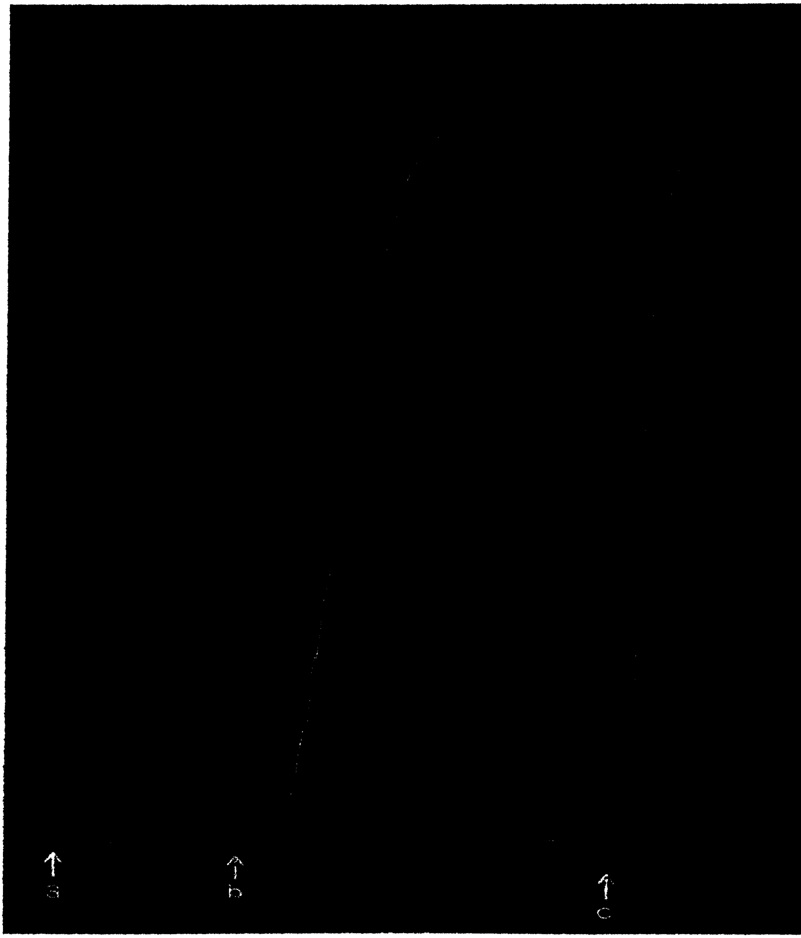


GRAPHIQUE X. — Utérus de cobaye, bain de 50 cent. cubes additionné de 2 milligrammes de 929 F. *a*, $BaCl_2$; *b*, histamine 0 milligr. 02; *c*, acétylcholine 5 milligrammes.

le 929 F et 1571 F, soit 0,05 et 0 milligr. 1. Ce résultat s'oppose à ceux obtenus par Dale et Laidlaw [23] ; il rejoint, par contre, les conclusions de tous ceux qui, depuis, ont repris la question : Mackay [54], Krishnan [47], Bernheim [8], Feldberg [30]. Ce dernier conclut, en effet, qu'il est impossible de supprimer l'action de l'acétylcholine sur l'intestin de cobaye sans diminuer fortement, sinon supprimer, celle de l'histamine.

B. — Utérus de cobaye.

On sait l'extraordinaire sensibilité de l'utérus de cobaye non gravide vis-à-vis de l'histamine. Alors que l'acétylcholine



Graphique XI. — Utérus de cobaye isolé, bain de 50 cent. cubes additionné de 2 milligrammes d'atropine. *a*, acétylcholine 5 milligrammes; *b*, histamine 0 milligr. 02; *c*, $BaCl_2$ 10 milligrammes.

et le chlorure de baryum ne provoquent une contraction maxima qu'aux doses respectives de 5 milligrammes et 10 mil-

ligrammes (5), le même résultat peut être atteint avec 0 milligr. 02 d'histamine. La forme de la contraction est, dans les trois cas, superposable : forte contraction durable.

1° ACTION DES ANTIHISTAMINIQUES : 929 F. — Nous avons déjà signalé les difficultés rencontrées dans l'étude de l'action antihistaminique sur cet organe : la comparaison n'a donc été effectuée qu'avec le 929 F. L'addition de 2 milligrammes de ce produit à un bain de 50 cent. cubes, dans les conditions indiquées au Chapitre II, supprime totalement l'action de 0 milligr. 02 d'histamine ; elle supprime aussi totalement l'action de 10 milligrammes de $BaCl_2$; par contre, elle ne touche pas à l'action de 5 milligrammes d'acétylcholine (Graphique X).

2° ACTION DES PARASYMPATHOLYTIQUES : ATROPINE. — L'action nettement spécifique de l'atropine vis-à-vis de l'acétylcholine sur l'utérus a déjà été signalée par Feldberg [30]. Nous avons pu nous-même vérifier que 4 milligrammes d'atropine ajoutés au bain de 50 cent. cubes rendaient l'utérus insensible à l'action de 5 milligrammes d'acétylcholine, alors qu'il réagissait encore parfaitement à l'histamine et au chlorure de barium (Graphique XI).

3° ACTION DES SPASMOLYTIQUES : PAPAVÉRINE. — Avec la papavérine, il est impossible d'obtenir la dissociation entre les trois excitations. La dose de 4 milligrammes nécessaire pour

TABLEAU XIV.

NATURE DU BAIN Tyrode 50 cent. cubes avec	HISTAMINE 0 milligr. 02	ACÉTYLCHOLINE 5 milligrammes	$BaCl_2$ 10 milligrammes
Atropine, 2 milligrammes . .	+	0	+
929 F, 2 milligrammes. . . .	0	+	0
Papavérine, 2 milligrammes .	0	0	0

0, sans effet; +, contraction.

(5) Les doses sont données dans un bain de 50 cent. cubes de solution de Tyrode.

empêcher l'action de 10 milligrammes de $BaCl_2$ rend l'utérus pareillement inexcitable par l'acétylcholine et l'histamine.

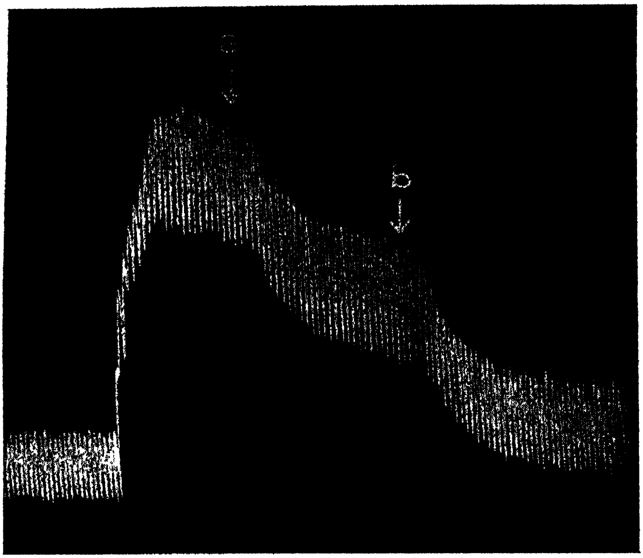
Le tableau XIV résume d'une façon schématique mais suggestive les résultats obtenus sur l'utérus de cobaye.

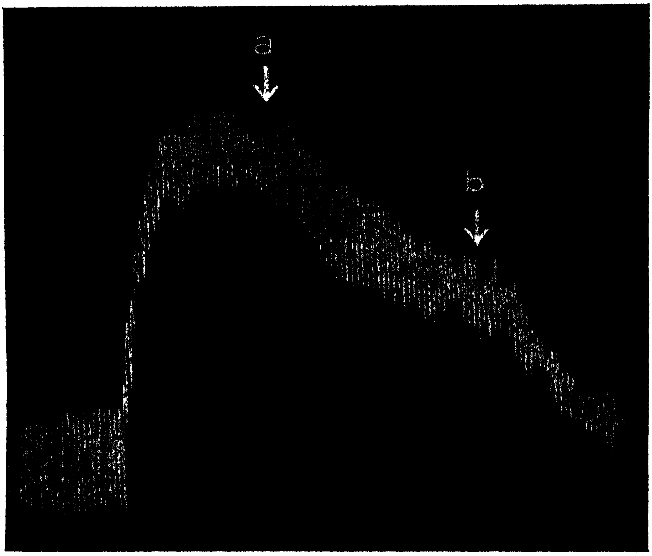
C. — Intestin de lapin.

Nous avons suivi sur cet organe la technique préconisée par Fromherz [35] pour l'étude des spasmolytiques. Nous avons comparé ainsi l'action du 929 F et de quelques produits à celles de l'atropine et de la papavérine sur le spasme provoqué par l'acétylcholine ou le chlorure de barium.

Une anse intestinale de 2 à 3 centimètres est prélevée sur un lapin saigné par section des carotides, après avoir été endormi au narcosol ou à l'évipan ; l'anse est immédiatement plongée dans une solution de Tyrode aux environs de 38° (NaCl, 8 ; $CaCl_2$, 0,20 ; KCl, 0,20 ; $MgCl_2$, 0,01 ; Co_3NaH, 1 ; Po_4Na_2H, 0,05 ; glucose, 1 ; eau, q. s. pour 1.000), puis suspendue à un stylet inscripteur dans un bain de la même solution aéré et maintenu à 38°. Dans de telles conditions, le péristaltisme intestinal se maintient pendant une heure et plus. On obtient alors une contraction tonique de l'intestin, avec arrêt plus ou moins accentué du péristaltisme, lorsqu'on ajoute au bain 0 milligr. 1 d'acétylcholine ou 20 milligrammes de $BaCl_2$. L'addition d'un spasmolytique au bain, pendant cette contraction, relâche l'intestin. L'activité spasmolytique du produit est alors mesurée par la dose capable de produire le relâchement total du spasme.

1° Action des parasympatholytiques : atropine. — L'action spécifique de l'atropine sur l'acétylcholine est encore très nette sur cet organe. L'atropine relâche en effet le spasme provoqué par 0 milligr 1 d'acétylcholine dès la dose de 0 milligr. 005 (dans un bain de 100 cent. cubes), tandis que 10 milligrammes ne relâchent pas encore le spasme provoqué par 20 milligrammes de $BaCl_2$. Ces chiffres fournis par nos expériences personnelles s'apparentent tout à fait à ceux obtenus par Fromherz (0 milligr. 001 à 0 milligr. 01) [Graphique XII].

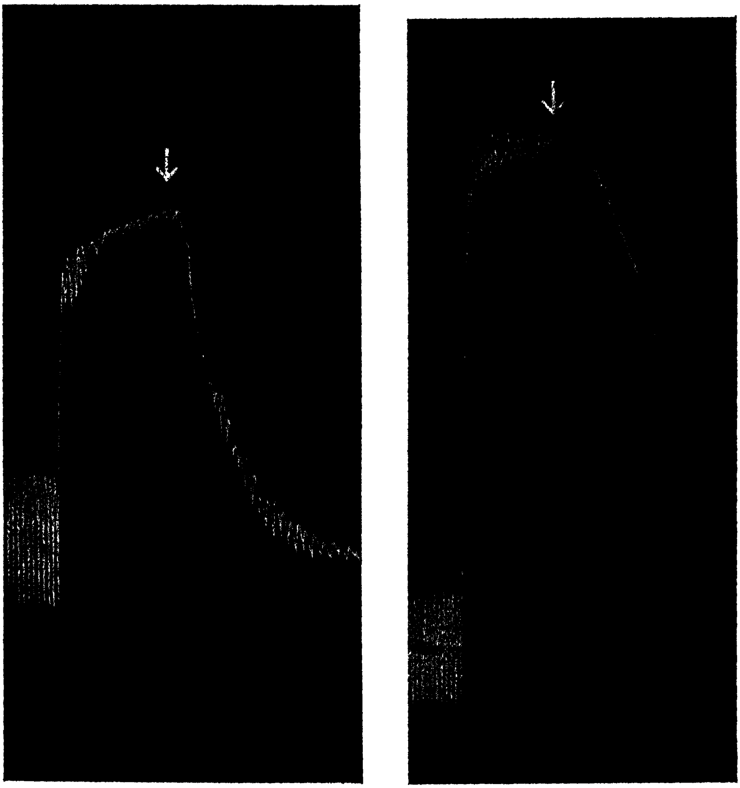




II

Graphique XII. — Pouvoir spasmolytique, contraction d'une anse intestinale isolée de lapin sous l'action de 0 milligr. 2 d'acétylcholine (bain de 100 cent. cubes). En I : *a*, addition de 0 milligr. 001 ; *b*, addition de 0 milligr. 005 d'atropine. En II : *a*, addition de 0 milligr. 5; *b*, addition de 1 milligramme de 929 F.

2° ACTION DES SPASMOLYTIQUES : PAPAVÉRINE, PROPAVINE. — A l'inverse de l'atropine, les spasmolytiques agissent à la même dose sur l'acétylcholine et sur le chlorure de barium : 2 à 5 milligrammes de papavérine relâchent le spasme provoqué par 0 milligr. 1 d'acétylcholine comme celui provoqué par



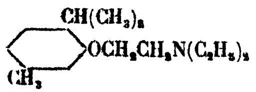
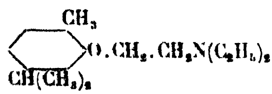
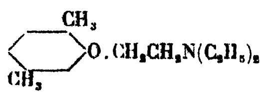
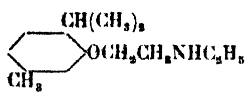
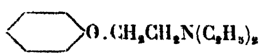
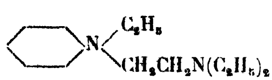
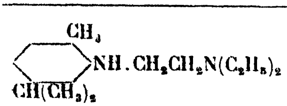
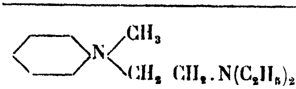
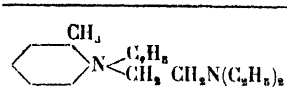
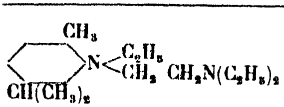
III IV

GRAPHIQUE XII *bis*. — Pouvoir spasmolytique, contraction d'une anse intestinale isolée de lapin sous l'action de 0 milligr. 2 d'acétylcholine (bain de 100 cent. cubes). En III, addition de 10 milligrammes de 1571 F. En IV, addition de 5 milligrammes de papavérine.

20 milligrammes de $BaCl_2$; 0,5 à 1 milligramme de « Propavine » relâchent les deux spasmes d'égale façon (Graphique XII *bis*).

3° ACTION DES ANTIHISTAMINIQUES. — Les antihistaminiques

TABLEAU XIV *bis*.

NUMÉRO	FORMULE CHIMIQUE	SÉRIE CHIMIQUE	DOSES actives sur le spasme provoqué par l'acétylcholine en milligrammes
929 F		Phénoxyéthylamine.	0,5-1
1379 F		Phénoxyéthylamine.	1-2
1655 F		Phénoxyéthylamine.	2-5
1482 F		Phénoxyéthylamine.	2
928 F		Phénoxyéthylamine.	10-50
1571 F		Ethylènediamine.	5-10
1691 F		Ethylènediamine.	2
1335 F		Ethylènediamine.	20
1599 F		Ethylènediamine.	2
1699 F		Ethylènediamine.	1
1167 F		Ethylènediamine.	10 20

sont capables de relâcher le spasme intestinal provoqué par l'acétylcholine ou le $BaCl_2$. Par leur mode d'action, ils se rattachent aux spasmolytiques : la même dose relâche l'intestin contracté par l'un ou l'autre excitant. Il a été impossible de comparer par cette méthode l'action antihistaminique et l'action spasmolytique, car l'histamine n'exerce qu'un effet minime sur cet organe.

On remarque tout de suite, dans la liste du tableau XIV *bis*, les doses plus élevées correspondant à une action spasmolytique plus faible du 928 F parmi les phénoxyéthylamines, des 1571 F, 1335 F et 1167 F parmi les Nphényléthylènediamines Or, en se reportant aux formules chimiques, on constate que ces quatre corps sont justement ceux dont le noyau ne porte aucune substitution. On en conclut donc à l'augmentation d'activité spasmolytique par l'apport sur le noyau d'un groupement méthyl ou isopropyl.

D. — Discussion.

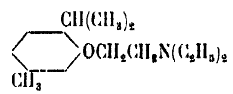
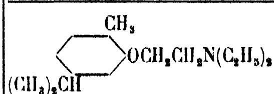
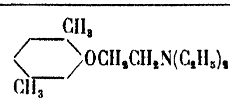
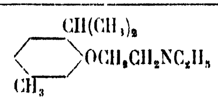
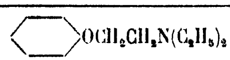
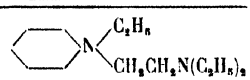
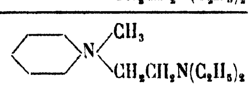
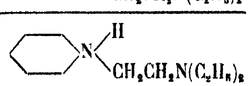
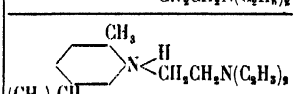
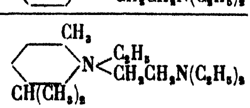
De tous ces faits, nous pourrons tirer trois conclusions :

1° Les produits étudiés ne peuvent pas être assimilés aux parasympatholytiques dans leur action sur les muscles lisses. En effet, si l'action de l'atropine s'apparente à celle des antihistaminiques sur l'intestin du cobaye, elle s'en écarte totalement sur les organes où sa spécificité vis-à-vis de l'acétylcholine est très marquée : utérus de cobaye, intestin de lapin.

2° Les expériences effectuées *in vitro* sur les intestins et l'utérus du lapin et du cobaye ont permis de mettre en évidence l'action spasmolytique du 929 F. Cet effet, comme d'ailleurs celui des autres phénoxyéthylamines se rapproche, à cet égard de celui que l'on peut reconnaître à la papavérine ou à la « Propavine » (tableau XVI). Toutefois, pour des indices spasmolytiques égaux, tous les indices ayant trait à l'histamine sont beaucoup plus faibles pour la « Propavine » que pour le 929 F.

La comparaison entre les indices spasmolytiques et antihistaminiques, telle qu'elle ressort des résultats consignés dans le tableau XV, permet de constater un certain parallélisme entre l'antagonisme qu'exercent ces éthers phénoliques vis-à-vis de l'histamine et vis-à-vis du $BaCl_2$.

TABLEAU I

NUMÉRO DU PRODUIT	FORMULE CHIMIQUE	SÉRIE CHIMIQUE
Papaverine.		(Spasmolytique)
« Propavine ».	$(C_3H_7)(C_6H_5)CH\ CO.O.CH_2CH_2N(C_2H_5)$	(Spasmolytique).
929 F		Phénoxyéthylamine
1379 F		Phénoxyéthylamine.
1655 F		Phénoxyéthylamine.
1482 F		Phénoxyéthylamine
928 F		Phénoxyéthylamine
1571 F		Aniline.
1335 F		Aniline.
1167 F		Aniline.
1691 F		Aniline.
1599 F		Aniline.
1699 F		Aniline.

I. ah., indice antihistaminique (choc); I. ah. i., indice antihistaminique intestinal, I. sp.,

XV.

DOSES ACTIVES contre l'histamine sur l'intestin du cobaye en milligrammes	DOSES ACTIVES sur le spasmo de l'intestin du lapin en milligrammes	I. AH.	I. AH I.	I. SP.
0,2	2-5	1	5	20 50
0,2	0,5-1	1,5	5	100-200
0,005-0,01	0,5-1	3	100-200	100-200
0 005 0,01	1-2	3	100-200	50-100
0,04	2-5	2	25	20-50
0,04	2	1	25	50
0,1-0,5	10-50	1	2-10	2-10
0,005-0,01	5-10	4	100-200	10 20
0,04	20	1,5	25	5
0,1	10-50	1	10	2-10
0,01-0,02	2	3	50 100	50
0,04-0,05	2	1,5	20-25	50
0,02	1	1	50	100

spasmolytique.

Le même tableau XV met en évidence la divergence profonde qui sépare les effets spasmolytiques et antihistaminiques des Nphényléthylènediamines. Nous avons en effet noté que toutes les Nphényléthylènediamines à noyau non substitué ne présentaient qu'un faible pouvoir spasmolytique. Or, c'est à ce groupe qu'appartient le 1571 F, le plus actif antihistaminique étudié jusqu'ici De plus, dans la série du 1571 F comme dans les autres (1167 F, 928 F), l'action spasmolytique augmente par addition des groupements méthyl ou isopropyl sur le noyau, alors que l'on peut noter la diminution de l'action antihistaminique à la suite des mêmes modifications chimiques (1599 F, 1699 F).

TABLEAU XVI.

PRODUIT	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX				INDICES			
	Effet spasmolytique sur l'intestin du lapin dose active en milligramme	Effet antihistaminique sur l'intestin du cobaye dose active en milligramme	Effet antihistaminique Bronchoconstriction histaminique p. 100	Antagonisme sur la toxicité de l'histamine en d. m. m.	I. Sp.	I. ah. i.	I. ah. b.	I. ah. c.
929 F .	0,5-1	0,005-0,01	9	3	100-200	100-200	88	3
« Propavine ».	0,5-1	0,2	38	1,5	100-200	5	52	1,5

I. Sp., indice spasmolytique ; I. ah. i., indice antihistaminique intestinal, I. ah. b., indice antihistaminique bronchique ; I. ah. c., indice antihistaminique (choc).

3° L'action antihistaminique du 1571 F semble plus spécifique que celle du 929 F, puisque, tout en présentant une action spasmolytique beaucoup plus faible sur le spasme intestinal du lapin, le 1571 F possède la même activité antihistaminique sur l'intestin de cobaye et une activité supérieure sur le choc histaminique du même animal.

La plus grande spécificité du 1571 F se manifeste aussi par sa faible action sur l'intestin de cobaye vis-à-vis des excitations provoquées par le $BaCl_2$ et l'acétylcholine (graphique IX).

II

MODE D'ACTION

Nous étant proposé, au début de ce travail, de rechercher des produits synthétiques susceptibles de s'opposer à l'action de l'histamine, nous avons conclu à l'activité de deux groupes de corps nettement distincts chimiquement : les phénoxyéthylamines et les Nphényléthylènediamines (6). Ce fait pose immédiatement un problème physiologique infiniment délicat, celui de la nature de l'antagonisme ainsi constaté. Puisque le test employé dans nos recherches est justement le choc histaminique du cobaye, nous avons été amenée à rechercher par quelle transformation l'organisme du cobaye devient capable de résister à plusieurs doses mortelles d'histamine. Certes, il n'est pas dans notre intention de trancher une question si complexe : tant de problèmes analogues déjà anciens restent toujours sans réponse. Depuis que Bézoldt, en 1867, introduisit le premier en physiologie la notion d'antagonisme, avec ses expériences sur l'atropine, des exemples semblables ont foisonné, tout spécialement en ces dernières années, après l'introduction de produits synthétiques en physiologie.

Comment l'atropine s'oppose-t-elle aux actions de l'acétylcholine ? Comment l'ergotamine ou le 933 F s'opposent-ils aux actions de l'adrénaline ? Il ne saurait plus être question aujourd'hui de mettre en cause une action paralysante des nerfs sympathiques ou parasympathiques, puisqu'il est démontré que ces nerfs n'agissent justement sur les muscles que par la libération d'un médiateur : adrénaline ou acétylcholine. Certains auteurs ont émis les hypothèses les plus diverses : Clark [**16**] fait intervenir des « Haptophores » blocables par l'antagoniste et rendus, par ce fait, incapables de fixer le poison, d'où l'inactivité de celui-ci. Morrisson et Lis-

(6) Nous avons été heureuse de voir confirmer l'action antihistaminique du 929 F par M. G. R. Rosenthal, de Chicago (communication inédite).

sak [61], au sujet du 933 F, invoquent une destruction plus rapide de l'adrénaline au sein des cellules ; malheureusement, les expériences entreprises dans cette voie ne sont pas encore assez probantes pour permettre l'élaboration d'une théorie et l'on reste toujours dans le domaine des hypothèses.

Il ne pourrait donc être question ici d'expliquer le nouvel antagonisme introduit en physiologie : antihistaminique-histamine. Nous voudrions seulement tirer des faits rapportés dans ce travail quelques réflexions qui, peut-être, permettront de jeter un peu de lumière sur ce problème, en espérant qu'elles aideront à lui trouver plus tard une solution.

Rôle des bronches dans le choc histaminique du cobaye

On sait que, selon les recherches classiques de Dale et Laidlaw [23], la mort du cobaye ayant reçu de l'histamine est la conséquence d'un spasme des muscles bronchiques et survient par asphyxie. L'examen des poumons après la mort montre une distension d'autant plus faible que la dose donnée est plus forte. « Un tel résultat, concluent les auteurs, ne peut être imputé qu'à une constriction des bronchioles par spasme de leur revêtement musculaire, quoique l'effet puisse être accentué par l'accroissement simultané de la sécrétion bronchique. »

Nous-même avons pu, d'ailleurs, protéger des cobayes contre une dose mortelle d'histamine en les maintenant sous respiration artificielle ; par contre, si nous avons pu retarder la mort après injection de 2 doses minima mortelles, il nous a été impossible d'empêcher l'action fatale du poison dans ce cas.

Rôle des bronches dans la protection.

Puisque les bronches semblent jouer le rôle principal dans l'intoxication histaminique du cobaye, il nous a paru logique de faire porter la protection, exercée par nos antihistaminiques, sur cet organe : le cobaye protégé ne mourrait pas parce que ses bronches seraient moins fortement contractées que celles d'un animal normal. Or, si en étudiant l'action des antihista-

miniques sur la bronchoconstriction, il nous a été possible de constater le parallélisme entre cette action et l'action sur le choc des produits appartenant à une même série chimique, nous avons pu remarquer, par contre, que :

1° Un spasmolytique : la « Propavine », tout en protégeant plus fortement les bronches que le 1655 F contre le spasme histaminique, lui était inférieur en ce qui concerne la survie du cobaye.

2° Certaines Nphényléthylènediamines plus actives sur le choc histaminique que les phénoxyéthylamines leur étaient inférieures dans la protection du poumon (929 F et 1571 F, 1482 F et 1699 F).

3° Certaines Nphényléthylènediamines encore actives sur le choc histaminique du cobaye étaient dépourvues de toute activité sur les bronches (tableau XIII).

La protection des bronches ne peut donc expliquer seule la résistance à l'histamine acquise par l'organisme du cobaye traité. En particulier, si les bronches répondent, dans certains cas, à l'injection d'histamine, chez l'animal protégé et chez l'animal normal, par une égale bronchoconstriction, on est amené à se demander si la différence de comportement des deux animaux vis-à-vis du choc n'est pas en rapport avec une diminution de l'histamine libre dans le sang.

Hanke et Koessler [42] ont montré que l'histamine injectée dans la veine d'un cobaye pouvait être en partie retrouvée dans le foie, l'intestin et l'estomac. Seule, une fraction q de la dose injectée arrive donc jusqu'aux poumons et y provoque le spasme bronchique. On peut imaginer que, chez l'animal protégé, une plus forte proportion de l'histamine injectée se trouve soit fixée, soit détruite dans les viscères, en sorte que les poumons ne recevront plus qu'une faible fraction q/n de la dose d'histamine, ce qui expliquerait la protection exercée sur le choc en dépit de l'inaction du produit observée sur les bronches isolées.

Avec les produits très actifs comme le 1571 F, cette propriété, acquise par l'organisme de retenir une partie de l'histamine, s'ajouterait au pouvoir anticonstricteur observé sur les bronches isolées.

Pour entraîner la mort d'animaux traités par ces produits, il faudrait que les poumons reçussent une quantité *mq* d'histamine (*q* étant la quantité d'histamine parvenant aux poumons des animaux normaux après l'injection de 1 dose minima mortelle). D'autre part, après l'injection de 1 dose minima mortelle aux animaux protégés, il ne parviendrait que la fraction *q/n'* d'histamine à leurs poumons. Il faudra donc leur injecter *m.n'* doses minima mortelles pour obtenir un choc histaminique fatal. Ce serait ce facteur *m.n'* que représenteraient nos indices « antihistaminiques » (choc).

La différence observée entre la série des phénoxyéthylamines et celle des Nphényléthylènediamines proviendrait alors de la part plus ou moins grande jouée par l'une ou l'autre de ces actions : le 1571 F et les Nphényléthylènediamines agiraient plus fortement sur la rétention de l'histamine dans l'organisme ; l'action du 929 F et des phénoxyéthylamines porterait plus spécialement sur les muscles bronchiques.

Comment concevoir cette rétention plus grande de l'histamine, dans l'organisme du cobaye ayant reçu l'un de nos antihistaminiques ?

Tentante était l'hypothèse d'une action favorisante des antihistaminiques sur la dégradation de l'histamine, malheureusement aucune preuve expérimentale n'est venue la confirmer.

Il ne peut s'agir en effet, ici, d'une destruction directe de l'histamine par les antihistaminiques. C'est ce que montrent les résultats suivants, conformes à ce que la constitution chimique des produits laissait prévoir. On mélange 0 milligr. 1 de 929 F avec 0 milligr. 01 d'histamine, puis l'on ajoute cette solution au bain de Tyrode-Webster, contenant un fragment d'intestin de cobaye : on obtient alors une contraction plus faible que celle obtenue avec l'histamine seule, mais très nette, contrairement à ce qui se produit lorsque la même quantité d'antihistaminique est ajoutée au bain avant l'histamine (l'action de celle-ci est alors complètement supprimée). Si on laisse pendant quelques heures à l'étuve le mélange précédent, l'action excitante ne disparaît pas, indiquant par là que l'histamine n'a subi aucune destruction.

Puisqu'il n'y avait pas de destruction directe de l'histamine,

nous avons supposé une action favorisante de nos produits sur le mécanisme habituel de dégradation dans l'organisme.

HISTAMINASE.

Il semble bien, depuis quelques années, qu'on puisse rattacher la dégradation de l'histamine, en grande partie, à l'action d'une diastase spécifiquement histaminolytique : l'histaminase.

Best [9], le premier, en 1929, mettait en évidence la présence de cette diastase dans les poumons du bœuf *in vitro*. Ses expériences furent confirmées, dans la suite, par celles de Binet et Marquis [10] sur le poumon de chien *in vivo* et *in vitro*. Eldbacher et Zeller [28] ont pu retrouver l'histaminase dans de nombreux organes de différentes espèces : reins, intestin, foie de cobaye ; reins, foie, intestin de bœuf, etc. Tout récemment, Marcou [58] la décèle dans le sang, contrairement aux résultats négatifs obtenus jusqu'ici par Busson et Kirschbaum [15], Popielski [64] et Koskowski [46]. Enfin, l'activité de l'histaminase extraite de la poudre d'intestin a même pu être mise en évidence *in vivo*. Rigler [66] en Allemagne, Takebayaski [77] au Japon rapportent les résultats obtenus sur quelques intoxications humaines rattachées à l'histamine ; l'auteur japonais a, en outre, établi son action contre les diverses manifestations de l'histamine sur le métabolisme du chat et du lapin.

ACTION DU 1571 F SUR L'HISTAMINASE.

Il nous a paru intéressant de rechercher si l'activité de l'histaminase était augmentée *in vitro* en présence d'un antihistaminique. Les expériences faites dans ce but avec le 1571 F furent malheureusement totalement négatives.

Nous avons opéré suivant une des méthodes décrites par Eldbacher et Zeller [28]. Nous avons utilisé l'histaminase contenue dans la poudre de reins de bœuf, celle-ci ayant été obtenue par dessiccation de l'organe pendant quarante-huit heures dans le vide sulfurique. On laisse en contact 25 grammes de poudre et 500 cent. cubes d'une solution de NaCl à 5 p. 100, pendant une heure à 38°, sous agitation constante. Le liquide

recueilli après centrifugation contient la diastase. Pour mettre en évidence la propriété histaminolytique de cet extrait, il suffit de laisser à l'étuve un flacon contenant 10 cent. cubes de l'extrait, 0 milligr. 5 d'histamine, 15 cent. cubes de solution tampon à *p*H 7 et 2 cent. cubes de toluène, avec barbotage d'oxygène. Après vingt-quatre heures, l'histamine a plus ou moins totalement disparu, comme l'atteste alors un essai du liquide sur l'intestin isolé de cobaye. Si, au lieu de 0 milligr. 5, on ajoute 1 milligramme d'histamine, il n'en disparaît plus qu'une partie, environ la moitié, après séjour de vingt-quatre heures à l'étuve.

Nous avons donc recherché s'il était possible d'obtenir une plus forte destruction de l'histamine en ajoutant au mélange précédent 25 milligrammes de 1571 F (la concentration en antihistaminique atteignant ainsi 1/1.000). La difficulté résidait alors dans le dosage biologique : la présence du 1571 F dans la solution à tester supprimant en effet toute réponse du muscle lisse à l'histamine. Une question primordiale restait donc à résoudre : comment séparer l'antihistaminique et l'histamine? Nous espérions que la faible solubilité du 1571 F dans les solutions alcalines nous permettrait de la résoudre Malheureusement, tout le 1571 F ne précipite pas et son action se fait encore sentir dans le dosage biologique de la solution filtrée, diminuant la réponse de l'intestin à l'histamine. Nous avons alors réalisé l'expérience suivante. Trois flacons sont mis à l'étuve :

A contenant :

10 cent. cubes de l'extrait.
1 milligramme d'histamine (1 cent. cube d'une solution au 1/1.000 dans la solution tampon).
14 cent. cubes de solution tampon *p*H 7.
2 cent. cubes de toluène.

B contenant :

10 cent. cubes de l'extrait.
1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
14 cent. cubes de solution tampon.
2 cent. cubes de toluène.

C contenant :

10 cent. cubes de l'extrait.
1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
25 milligrammes de 1571 F (5 cent. cubes d'une solution 5/1.000 dans la solution tampon).
9 cent. cubes de solution tampon.
2 cent. cubes de toluène.

Vingt-quatre heures après, nous les avons retirés et avons constitué à ce moment un quatrième flacon servant de témoin.

D contenant :

10 cent. cubes de l'extrait.
1 milligramme d'histamine (1 cent. cube de la solution précédente).
14 cent. cubes de solution tampon.
2 cent. cubes de toluène.

Au flacon B, nous avons alors ajouté 5 cent. cubes de la solution de 1571 F utilisée pour C ; aux trois autres flacons, 5 cent. cubes de solution tampon.

Après séparation des albumines par acidification puis centrifugation (en vue de faciliter le filtrage ultérieur), après neutralisation, on ajoute 2 cent. cubes de soude normale à chacun des flacons. Les quatre extraits sont filtrés sur noir animal, puis neutralisés par 2 cent. cubes d'acide chlorhydrique normal : ils sont prêts pour l'essai biologique sur l'intestin isolé de cobaye.

Deux fractions du même intestin ont alors été préparées. Sur l'une d'elles, nous avons essayé successivement 1 cent. cube des flacons D, A, B ; sur l'autre, 1 cent. cube des flacons D, A, C. Nous avons noté les contractions correspondant aux différentes préparations :

Première série :

Histamine.	(Histamine + histaminase) 24 heures à l'étuve.	(Histamine + histaminase) + 1571 F 24 heures à l'étuve.
D	A	B

Deuxième série :

Histamine.	(Histamine + histaminase) 24 heures à l'étuve	(Histamine + histaminase + 1571 F) 24 heures à l'étuve.
D	A	C

Le rapport entre les contractions obtenues dans les deux séries reste le même, permettant de conclure à la même quantité d'histamine dans les flacons C et B. Donc la présence du 1571 F n'augmente pas l'action histaminolytique de l'histaminase *in vitro*.

Conclusion.

L'expérience montre que la résistance à l'histamine acquise par l'organisme du cobaye, après l'injection de nos antihistaminiques, ne peut s'expliquer totalement par la protection des bronches contre le spasme histaminique. On semble alors en droit d'invoquer une action particulière, encore inexplicable, grâce à laquelle seule une partie de l'histamine parviendrait aux poumons de l'animal protégé. Cette propriété, particulièrement marquée pour le 1571 F et les éthylènediamines tétrasubstituées, expliquerait la différence observée entre les produits de cette série chimique et ceux des autres séries au cours de l'étude relative aux rapports entre la constitution chimique et l'action antihistaminique (tableau V).

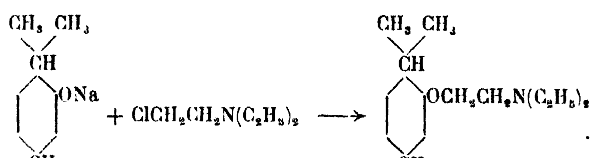
III

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE DU 929 F ET DU 1571 F

Devant la supériorité présentée par le 929 F et le 1571 F au cours de cette étude, il nous a semblé intéressant de connaître les propriétés pharmacologiques de ces produits :

A. — La (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine ou thymoxyéthyldiéthylamine (929 F).

Le 929 F s'obtient très facilement par action pendant douze heures du diéthylaminochloréthane sur le thymolate de sodium, en tube scellé à 140°.



929 F.

La base distille à 160-164° sous 25 millimètres de mercure.

Le chlorhydrate utilisé dans tous les essais physiologiques se présente sous forme de cristaux blancs fondant à 130-131°, bien solubles dans l'eau. On obtient alors une solution légèrement acide (*p*H 6,4), de laquelle la base précipite par neutralisation.

TOXICITÉ. — Le 929 F est une substance de toxicité moyenne. Voici les doses minima mortelles chez différentes espèces.

ESPÈCES	DOSE MINIMA MORTELLE en gramme par kilogramme	
	Sous cutanée	Intraveineuse
—	—	—
Cobaye	0,200	0,020
Souris	0,500	0,025
Lapin	0,200	0,025

La marche de l'intoxication par de fortes doses est la même chez les trois espèces : poly et hyperpnée, signes d'excitation médullaire, tremblements convulsifs, raideur des membres, opistotonus, hypothermie.

Les chiffres de toxicité n'ont rien d'anormal si on les compare à ceux de quelques autres produits. Ainsi, la dose intraveineuse mortelle pour le lapin prend place entre celle du (3)diéthylaminométhylbenzodioxan (883 F) : 0 gr. 030 par kilogramme, et celle de la diéthylaminoéthoxy (2)diphényl (1262 F) : 0 gr. 020 par kilogramme. Nous fûmes donc très étonnée de constater la vive intolérance marquée par toutes les espèces pour des doses faibles très éloignées de la dose minima mortelle.

La souris de 20 grammes, qui ne succombe qu'à 10 milligrammes (sous-cutanés), manifeste déjà des signes d'intolérance à 1 milligramme. Le chien éveillé présente des nausées dès l'injection sous-cutanée de 5 milligrammes par kilogramme de 929 F. Enfin, l'homme tolère très mal ce produit. Une heure et demie après l'ingestion d'un cachet de 1 milligr. 5, on a pu noter les symptômes suivants : courbature, spécialement aux muscles fatigués par un exercice antérieur, dyspnée par paralysie du diaphragme, dysphagie, hyper-

sensibilité de la peau, et spécialement du cuir chevelu, polyurie, hypotension.

Si l'on augmente la dose jusqu'à 2 centigrammes, les symptômes s'accentuent. Ils arrivent à un degré de violence tel que le patient est obligé de rester allongé, pris de vomissements, de douleurs musculaires violentes et de céphalées (observations du Dr Henry).

Il est à noter encore une intolérance particulièrement marquée chez un sujet très nerveux : après ingestion de 1 milligr. 5 il présente les troubles précédemment décrits, mais la difficulté à respirer va cette fois jusqu'à l'impression d'étouffement, le sujet est incapable de parler et de se tenir debout. Ce n'est que trois heures plus tard que les signes d'intolérance commencent à disparaître (observation du Dr Joltrain).

La fatigue musculaire intense caractéristique de cette intolérance rappelle la paralysie flasque observée sur nos animaux et celle notée par Okasaki [62] lorsqu'il donnait de la thymoxyéthyldiméthylamine à des grenouilles. Cet auteur met en évidence l'origine centrale de tels troubles : en excitant le bout périphérique du nerf sciatique au cours de la paralysie, il obtient la réponse normale du muscle. Il n'y a donc pas de paralysie musculaire.

Cette thymoxyéthyldiméthylamine, si voisine du 929 F, est toutefois beaucoup mieux tolérée que ce dernier puisqu'elle est couramment employée en thérapeutique par les Japonais sous le nom de « Tostramine ». Okasaki [62] note d'ailleurs l'absence d'effet émétique chez le chat à la dose de 30 centigrammes, contrairement à l'action du 929 F.

Remarquons enfin que les produits précédemment cités comme termes de comparaison sont parfaitement tolérés par l'homme, l'un, le 883 F, jusqu'à la dose de 15 centigrammes, l'autre, le 1262 F, jusqu'à la dose de 20 centigrammes.

Action locale. — **Le 929 F est très irritant, l'instillation d'une goutte d'une solution à 1 p. 100 dans l'œil d'un lapin produit immédiatement une vive rougeur accompagnée de larmoiement ; l'irritation persiste pendant plusieurs heures. L'injection d'une solution à 1 p. 100 sous la peau du cobaye**

provoque généralement une escarre au bout de quelques jours. Enfin, la pénétration du 929 F dans la peau par ionisation provoque un érythème avec papules urticariennes comparable à celui provoqué par l'histamine, mais beaucoup plus atténué que celui-ci.



GRAPHIQUE XIII. — Expérience du 12 janvier 1939 Chien 8 kilogrammes, respiration naturelle. Première ligne, respiration; deuxième ligne, péristaltisme intestinal; troisième ligne, pression carotidienne. En ↑ injection de 5 milligrammes par kilogramme de 929 F dans la veine saphène.

L'application du 929 F sur la peau ou l'introduction dans le derme n'amène aucune réaction apparente.

CIRCULATION ET RESPIRATION. — Le 929 F est hypotenseur. Sur le chien chloralosé l'injection intraveineuse de 5 milli-

grammes par kilogramme provoque une hypotension forte mais peu durable, elle provoque aussi une forte excitation respiratoire (graphique XIII).

Chez le lapin endormi à l'éther ou au « narcosol » (sel de sodium de l'acide éthobutyléthylbarb' urique), le 929 F est hypotenseur ; dans ce dernier cas, 0 milligr. 25 par kilogramme sont déjà nettement hypotenseurs. On retrouve par là les doses données par Maeda [55] sur le lapin uréthanisé (0 milligr. 5 par kilogramme).

Cette hypotension non modifiée par l'injection préalable d'atropine relève d'une action générale du 929 F sur les capillaires. Elle relève en partie aussi de l'action de ce produit sur le cœur. Ainsi constate-t-on en enregistrant les contractions du cœur de lapin qu'il est fortement déprimé par de grosses doses (4 milligrammes par kilogramme).

Muscles lisses. — C'est l'action excitante de la thymoxyéthyldiéthylamine sur l'utérus isolé de lapin qui attira sur elle l'attention des physiologistes japonais. Anan [2] est frappé par la faiblesse des doses actives : la concentration de 1/10.000, d'après lui, produit déjà une contraction de l'utérus. C'est l'ordre de grandeur des doses actives de l'ergotamine. Nous avons même pu obtenir une forte contraction avec 2 milligrammes dans un bain de 100 cent. cubes, ce qui donne une concentration de 2/100.000.

On retrouve cette action excitante sur les muscles bronchiques. Le 929 F est fortement bronchoconstricteur à la dose de 5 milligrammes par kilogramme chez le cobaye (D. Bovet [11]). Cette bronchoconstriction se manifeste encore sur des poumons isolés et perfusés suivant la méthode de Sollmann et Tainter.

Par contre, sur l'intestin, le 929 F agit comme un spasmolytique, il paralyse l'intestin *in situ* du chien chloralosé, détend aux faibles doses (0 milligr. 1 dans un bain de 100 cent. cubes) puis paralyse aux doses moyennes (1 milligr.) l'intestin isolé de lapin.

Propriétés sympatholytiques. — Les phénomènes de paralysie notés au cours de l'intoxication par le 929 F nous ayant fait penser à quelque action de ce produit sur le système

nerveux central, nous avons recherché s'il ne prolongerait pas la durée de la narcose à l'évipan : aucun résultat positif n'a pu être obtenu.

Par contre, l'action sympatholytique, ou plutôt adrénalinolytique du 929 F est bien connue. Il diminue l'action hypertensive de doses moyennes d'adrénaline chez le lapin (Okasaki [62], Maeda [55]) et chez le chien (D. Bovet et P. Maderni [12]). Il s'oppose à l'hyperglycémie adrénalinique du lapin (Asakura [4]), mais c'est surtout vis-à-vis des actions musculaires de l'adrénaline qu'il manifeste son action adrénalinolytique. Il inverse l'action paralysante de l'adrénaline sur l'intestin de lapin isolé (Anan [3], D. Bovet et Maderni [12]), supprime son action excitante sur l'utérus de lapine (Anan [3])(7).

B. — La NPhénylNÉthylN'diéthyléthylènediamine (1571 F).

Nous avons utilisé dans tous les essais physiologiques le chlorhydrate qui se présente sous la forme de cristaux blancs (p. f. 110°-114°) très facilement solubles dans l'eau et qui s'oxydent légèrement à l'air en prenant de ce fait une teinte grisâtre.

Toxicité. — Le 1571 F peut être placé exactement à côté du 929 F par les chiffres de sa toxicité pour les différentes espèces animales.

Espèces	Dose minima mortelle en gramme par kilogramme — Sous-cutanée	Intraveineuse
Cobaye	0,250	0,030
Souris	0,400	0,030
Lapin	0,250	0,025

Les signes d'intoxication se retrouvent les mêmes chez les trois espèces : frayeur, excitation, convulsions, tremblements,

(7) Cette action sympatholytique ne peut être mise en cause dans l'activité antihistaminique du 929 F. Les Japonais ont, en effet, étudié du point de vue sympatholytique plusieurs produits cités dans cet ouvrage (1379 F, 1482 F, 1483 F, etc.), la divergence entre leurs résultats et les nôtres écarte tout rapprochement possible entre l'activité antihistaminique et l'activité sympatholytique d'une même substance.

polypnée. On ne retrouve pas ici la grande intolérance observée pour les faibles doses de 929 F, la souris de 20 grammes supporte parfaitement 2 milligrammes sous-cutanés, mais ceci est particulièrement frappant chez le chien éveillé. Cet animal peut recevoir 20 milligrammes sous la peau sans manifester aucun trouble. Par contre, à 40 milligrammes, les signes d'intoxication sont très violents : ils semblent surtout d'origine centrale. L'animal manifeste tous les signes d'une hyper-excitation : agitation, aboiements. On ne retrouve pas ici l'effet émétique observé avec le 929 F.

Action locale. — Le 1571 F est un produit très irritant : une solution au 1/100 neutre au tournesol, injectée sous la peau d'un lapin ou d'une souris produit au bout de quarante-huit heures des escarres telles que la chair est mise à nu. L'instillation d'une goutte de la même solution dans l'œil d'un lapin ne provoque pourtant aucune irritation apparente.

Comme avec le 929 F, l'introduction dans la peau de l'homme du 1571 F par ionisation, provoque un placard érythémateux parsemé de petites papules urticariennes sur toute la largeur de l'électrode.

Circulation. Respiration. — Comme le 929 F, le 1571 F est hypotenseur, toutefois, il l'est moins fortement. Il faut atteindre la dose de 5 milligrammes par kilogramme pour observer, chez le chien chloralosé, une baisse de pression, peu durable d'ailleurs. Cet effet n'est pas empêché par injection préalable d'atropine. On retrouve aussi sur la respiration l'action excitante observée avec le 929 F (graphique XIV).

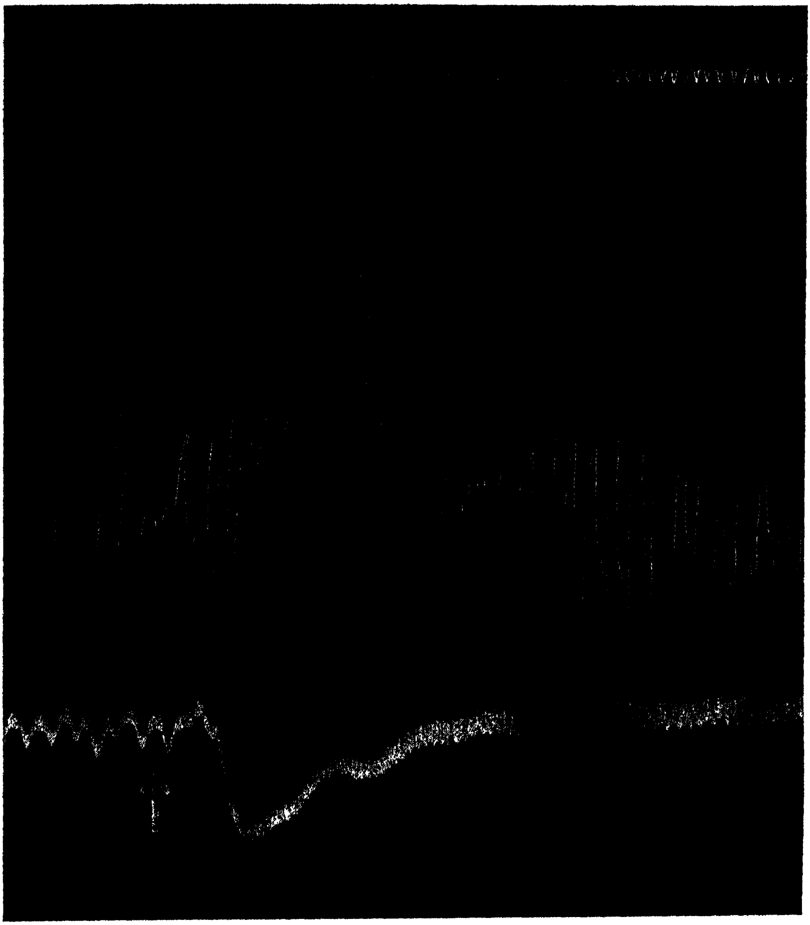
Sur le lapin endormi à l'uréthane ou au « narcosol », le 1571 F a une action hypotensive plus faible, là encore, que celle observée avec le 929 F. Ce que l'on peut rattacher, peut-être, à la faible action déprimante sur le cœur. Cette dépression n'est apparente sur le cœur suspendu de lapin qu'à la dose de 10 mililgrammes par kilogramme.

Muscles lisses. — A l'opposé du 929 F, le dérivé de l'éthylènediamine manifeste une action excitante sur l'intestin de chien *in situ* à la dose de 10 milligrammes par kilogramme.

Il élève le tonus de l'intestin de lapin isolé dès la dose de

0 milligr. 5 (dans un bain de 100 cent. cubes). Une concentration plus forte, 1 milligramme, produit l'arrêt du péristaltisme : le muscle restant en contraction tétanique.

Le 1571 F contracte fortement l'utérus isolé de lapin. Dès



GRAPHIQUE XIV. — Expérience du 12 janvier 1939. Chien 8 kilogrammes, respiration naturelle. Première ligne, respiration; deuxième ligne, péristaltisme intestinal; troisième ligne, pression carotidienne. En ↑ injection de 5 milligrammes par kilogramme de 1571 F dans la veine saphène.

la dose de 0 milligr. 1 (dans un bain de 100 cent. cubes) on obtient une très forte contraction comparable à celle obtenue avec une dose vingt fois plus forte de 929 F.

Enfin, le 1571 F contracte les bronches isolées de cobaye perfusées avec une solution de Tyrode suivant la méthode de Tainter, de la même façon que le 929 F.

IV

ACTION DU 929 F SUR QUELQUES PHÉNOMÈNES IMPUTABLES A L'HISTAMINE

Nous avons mentionné, au début de ce travail, le rôle attribué à l'histamine dans quelques phénomènes pathologiques. Il nous a semblé intéressant de rapporter ici les résultats obtenus avec le 929 F dans deux de ces cas. Nous joindrons à nos propres expériences sur le choc anaphylactique du cobaye, celles que M. Sohier a eu l'amabilité de nous communiquer sur l'intoxication expérimentale du cobaye par l'ypérite.

A. — Choc anaphylactique expérimental du cobaye

La formation d'histamine au cours du choc anaphylactique n'est plus à démontrer aujourd'hui. Dès 1910, les premières expériences de Manwaring [**56**] sur des chiens à circulation croisée, reprises plus tard par Tinel, Ungar et Zerling [**80**], établissaient la présence d'un principe actif dans le sang des chiens en état de choc. Ce principe actif a pu être identifié à l'histamine pendant ces dernières années par un grand nombre d'auteurs. Nous-même, en collaboration avec A. Simon [**68**], avons pu doser l'histamine présente dans le sang de cobaye, faisant un choc à la suite d'une injection d'arsénobenzol dans le ganglion lymphatique inguinal.

D'autre part, la formation d'histamine au cours du choc anaphylactique a été mise tout spécialement en évidence sur le foie du chien et les poumons du cobaye. Nous ne retiendrons que les résultats relatifs à ces derniers, puisque c'est sur le cobaye que nos expériences ont porté.

Bartosh, Feldberg et Nagel [**7**] montrent successivement :

1° Que le liquide perfusant un poumon sensibilisé, isolé, contracté ensuite par apport d'antigène, entraîne des subs-

tances qui se montrent bronchoconstrictrices sur un poumon normal.

2° Que ce perfusat a acquis d'autres propriétés : il contracte l'intestin isolé de cobaye, il possède une action hypotensive et adrénalinosécrétrice chez le chat atropinisé.

3° Que cette substance active est, comme l'histamine, stable à l'ébullition et soluble dans les alcools méthylique et éthylique.

Ces résultats, confirmés par Spinelli [**72**] puis Daly, Peat et Schild [**25**], sont complétés par ceux de Daly et Schild [**26**]. Ces auteurs montrent que la substance active du perfusat résiste à l'ébullition acide, comme l'histamine, et que ce perfusat de choc est inactivé par des préparations d'histaminase.

Ungar et Parrot [**82** et **83**] reprennent la question et mettent en évidence l'histamine dans une solution physiologique additionnée d'antigène dans laquelle baigne un fragment de poumon sensibilisé. Ces mêmes auteurs, en collaboration avec A. Levillain [**85**], établissent que sous l'action de l'acide ascorbique cette même formation d'histamine ne peut avoir lieu, confirmant par là l'hypothèse de Hochwald, selon qui l'acide ascorbique protégeait les animaux contre le choc en empêchant l'histamine de se former.

Certes, il n'est pas dans notre intention d'attribuer à la seule histamine tout le rôle dans le choc anaphylactique ; le problème est d'une autre complexité, et cela est apparu une fois de plus dans les récentes expériences de Lissak et Hodes [**53**]. Ces auteurs ont obtenu une protection contre le choc anaphylactique du chat avec le (3)pipéridinométhybenzodioxan (933 F) sans qu'il puisse s'agir ni d'une action sympatholytique (l'ergotamine n'agit pas) ni d'une action antihistaminique (le choc histaminique n'est pas évité). Du moins le rôle partiel de l'histamine semble-t-il certain ; la protection obtenue avec l'acide ascorbique est particulièrement éloquente sur ce point.

Nous avons donc recherché si le 929 F, dont nous avons établi les propriétés antihistaminiques, ne pourrait pas s'opposer au choc anaphylactique *in vivo* et *in vitro*. Nous avons choisi le cobaye comme animal d'expérience parce que c'est,

d'une part, l'espèce sur laquelle le choc anaphylactique mortel se manifeste de la façon la plus constante et que, d'autre part, c'est cet animal que nous avons utilisé dans toutes nos recherches sur les antihistaminiques.

1° *In vivo* — Les cobayes ont été sensibilisés par deux injections intra-péritonéales de 0 c. c. 5 de sérum de cheval à quarante-huit heures d'intervalle ; au bout de vingt et un jours l'injection déchaînante était faite dans la veine à la dose de 0 c. c. 25 à 1 cent. cube.

Nous avons alors constaté qu'en administrant une demi-heure avant l'injection déchaînante de sérum et par voie sous-cutanée une dose de 40 milligrammes de 929 F, il était possible d'observer une action protectrice nette de cette substance.

TABLEAU XVII.

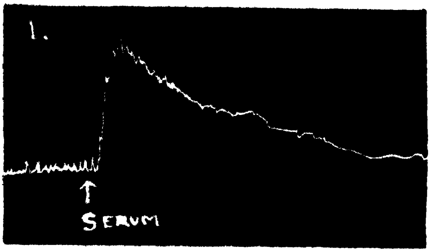
NUMÉRO	POIDS en grammes	929 F voie sous-cutanée en milligrammes par gramme	SÉRUM voie intraveineuse en centimètre cube	OBSERVATIONS
		Témoins :		
1. . .	390		1	Mort en 4 minutes.
2. . . .	520		1	Mort en 6 minutes.
3. . .	520		0,5	Mort en 2 minutes.
4.	500		0,5	Mort en 3 minutes.
5.	450		0,5	Mort en 2 minutes.
6 .	480		0,25	Mort en 3 minutes.
7. . .	450		0,25	Mort en 3 minutes.
8. .	500		0,25	Mort dans la nuit.
		Protégés :		
9.	460	40	1	Mort en 35 minutes.
10.	460	40	1	Mort en 23 minutes.
11. .	520	40	1	Choc, survie.
12. .	590	40	0,5	Pas de choc, survie.
13. . . .	440	40	0,5	Pas de choc, survie.
14.	420	40	0,5	Choc, survie.
15.	460	40	0,5	Choc, survie.
16.	480	40	0,5	Mort en 4 minutes.

Nous donnons dans le tableau XVII le protocole résumé d'une expérience.

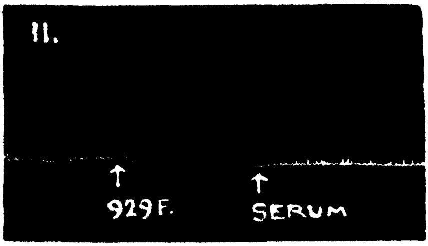
Les cobayes ayant reçu du 929 F montrent soit une prolongation du temps de survie, par rapport aux animaux témoins

(à la dose de 1 cent. cube de sérum), soit une survie définitive (à la dose de 0 c. c. 5).

La protection ainsi assurée est momentanée. Elle ne semble pas en outre, dans nos expériences, s'accompagner de phénomènes importants de désensibilisation. Les animaux protégés et ayant survécu ont reçu à nouveau la même dose de sérum,



I, action de 2 cent. cubes de sérum sur l'intestin immergé dans la solution de tyrode pure.



II. action de 2 cent. cubes de sérum sur l'intestin après adjonction de 929 F (1/100.000).

GRAPHIQUE XV. — Action du 929 F sur le phénomène de Dale.

un, deux ou sept jours après la première injection déchaînante. ils sont alors morts dans un laps de temps identique à celui observé chez les témoins. Par contre, S. R. Rosenthal, reprenant la même question en Amérique, observe une certaine désensibilisation. Des animaux protégés ayant survécu ne font pas de choc lorsqu'on leur injecte une nouvelle dose déchaînante vingt-quatre heures après la protection.

L'opposition entre ces résultats provient peut-être de la différence entre les doses déchaînantes nécessaires pour obtenir

un choc mortel dans les deux séries d'expériences : 0 c. c. 1-0 c. c. 15 pour l'auteur américain, 0 c. c. 25 à 0 c. c. 75 pour nous.

2° *In vitro*. — Utilisant les expériences de Dale [21] sur les réactions anaphylactiques des organes isolés, nous avons étudié sur les fragments d'intestin provenant de cobayes sensibilisés trois semaines auparavant par la technique précédemment décrite, la sensibilité au sérum de segments baignant soit dans une solution de Tyrode-Webster pure, soit dans une solution de Tyrode-Webster contenant du 929 F.

Quatre fragments de la région terminale de l'iléon sont simultanément prélevés et immergés dans quatre récipients de 100 cent. cubes, leurs contractions étant enregistrées par un myographe à levier, le 929 F est ajouté au liquide de Tyrode-Webster de deux des bains de façon à obtenir une concentration de 1 p. 100.000 dans chacun de ceux-ci, puis 2 cent. cubes de sérum sont ajoutés à chacun des récipients On constate dans ces conditions que les intestins immergés dans la solution de Tyrode pure se contractent violemment sous l'action du sérum, alors que les intestins traités par le 929 F ne se contractent pas. Il est ainsi possible de mettre en évidence la protection exercée par le 929 F vis-à-vis d'une réaction anaphylactique en dehors de toute action centrale (fig. XV).

L'action protectrice du 929 F dans le choc anaphylactique ajoute un nouvel argument en faveur du rôle joué par l'histamine dans ce phénomène

B. — Intoxication expérimentale du cobaye a l'ypérite.

Lorsqu'on injecte sous la peau d'un cobaye une émulsion d'ypérite dans de l'eau physiologique, on observe :

1° Une très forte réaction locale.

2° De nombreux troubles généraux : troubles nerveux (convulsions, stupeur), nausées, diarrhée, hypotension, hypothermie.

La présence d'une grosse réaction locale fait dire à M. Sohier, dans sa conférence sur les « caustiques vésicants » [69] :

« Il semble bien que très peu du toxique en nature puisse

diffuser dans l'économie... On arrive donc à douter que ce soit le produit lui-même qui, répandu dans l'organisme, provoque à distance des symptômes aussi diffus. » D'où l'idée d'un toxique intermédiaire. La pathogénie de l'intoxication rappelant beaucoup les troubles consécutifs à l'injection d'histamine, et surtout l'histaminémie du chien ypérité, suggèrent à M. Sohier que l'histamine intervient dans le déterminisme des phénomènes généraux auxquels succombent les animaux ypérités.

C'est en partant de cette hypothèse que fut recherchée l'action protectrice du 929 F sur le cobaye ypérité.

L'antihistaminique est injecté sous la peau (40 milligrammes par kilogramme) à des intervalles de temps variables après l'injection d'ypérite. Tous les animaux ainsi traités ont montré soit une prolongation du temps de survie, plus ou moins longue, soit même une survie définitive. Notons que c'est la première fois qu'une telle protection peut être observée, toute une série de sympatholitiques et de sympathomimétiques ayant été essayés préalablement sans succès.

Là encore, l'action protectrice du 929 F apporte donc un nouvel argument en faveur de la théorie histaminique.

Par ces deux exemples, on voit l'intérêt que pourraient présenter nos antihistaminiques dans l'étude de phénomènes où l'histamine semble jouer un rôle ; aussi avons-nous le ferme espoir que ces deux faits expérimentaux seront le point de départ de toute une série de recherches nouvelles.

CONCLUSIONS

Dans cette étude de quelques produits antagonistes de l'histamine, nos recherches ont abouti aux conclusions suivantes :

1° Prenant comme test de comparaison le nombre de doses minima mortelles d'histamine nécessaires pour tuer le cobaye ayant reçu préalablement 5 milligrammes du produit dans la veine, nous avons pu mettre en évidence la supériorité d'action de deux produits, la (2)isopropyl(5)méthylphénoxyéthyldiéthylamine (929 F) après laquelle le cobaye ne succombe qu'à

l'injection de 3 doses minima mortelles, et la NphénylNéthyl-N'diéthyléthylènediamine (1571 F), après laquelle il faut donner 4 et 5 doses minima mortelles pour obtenir la mort de l'animal.

2° Etudiant les rapports entre la constitution chimique et l'activité antihistaminique de quelques dérivés des phénoxy-éthylamines et des éthylènediamines, nous avons pu montrer :

a) L'infériorité des amines secondaires et primaires par rapport aux amines tertiaires (phénoxyéthyldiéthylamines et N'diéthyléthylènediamines).

b) La similitude d'action des phénoxyéthyldiéthylamines et des NphénylN'diéthyléthylènediamines portant les mêmes groupements sur le noyau benzénique. L'activité croît suivant l'ordre suivant :

Méthylphényl — diméthylphényl — isopropylméthylphényl.

Les positions réciproques des groupements sur le noyau ne semblent pas entrer en cause.

c) L'activité très particulière des éthylènediamines tétra-substituées :

N phényl N { méthyl, éthyl N'diéthyléthylènediamine, isopropyl.

Le maximum d'activité étant obtenu avec l'alcoyl, éthyl (1571 F), les mêmes modifications du noyau benzénique, favorables dans les cas précédents, deviennent alors nettement défavorables, l'activité devenant même nulle avec la combinaison : méthylisopropylphényl.

3° L'antagonisme vis-à-vis de l'histamine de tous ces produits ne se révèle pas seulement sur le choc histaminique du cobaye, mais encore sur les excitations provoquées par l'histamine sur les muscles lisses (intestin, estomac, utérus, bronches).

4° Cet antagonisme ne se manifeste pas dans les phénomènes vasculaires, sauf dans les cas où l'histamine provoque une hypertension, celle-ci se trouvant alors inversée (lapin en état de profonde narcose).

5° L'action antihistaminique manifeste sur les muscles lisses ne peut pas être rattachée à une action parasympatholy-

tique. Elle ne peut être que partiellement rattachée à une action spasmolytique, celle-ci étant particulièrement faible chez les éthylènediamines tétrasubstituées.

6° On ne peut pas rattacher entièrement la résistance à l'histamine, acquise par l'organisme du cobaye sous l'action d'un antihistaminique, à la protection des bronches contre le spasme histaminique. Celle-ci, attribuable en partie à une action spasmolytique, jouerait le principal rôle dans l'activité du 929 F. Elle n'entrerait que partiellement en jeu dans la protection exercée sur le cobaye par le 1571 F. Il faudrait invoquer alors une action proprement antihistaminique, grâce à laquelle seule une faible fraction de l'histamine injectée parviendrait jusqu'aux poumons. Aucun fait expérimental ne permet actuellement d'élucider cette action proprement antihistaminique. Les expériences ayant trait à l'action du 1571 F sur l'activité histaminolytique de l'histaminase *in vitro* furent totalement négatives.

7° L'étude pharmacologique des deux principaux antihistaminiques : 929 F et 1571 F ne présente pas de particularités frappantes. A noter seulement la très grande intolérance de toutes les espèces animales (même l'homme) pour les faibles doses de 929 F.

8° La protection exercée par le 929 F dans le choc anaphylactique expérimental du cobaye et l'intoxication du même animal par l'ypérite, ajoute un nouvel argument en faveur du rôle joué par l'histamine dans ces deux phénomènes. Elle souligne l'intérêt que peuvent présenter nos antihistaminiques dans tous les phénomènes où le rôle de l'histamine a pu être invoqué.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Ackermann (D.) et Kutscher (Fr.). *Zeit. f. Biol.*, **54**, 1910, p. 387.
[2] Anan (S.). *Fol. Pharm. Jap.*, **9**, 1929, p. 6, cité par Lévy (J.) et Justin-Besançon (L.). Congrès de Médecine française, 1936.
[3] Anan (S.). *Jap. Journ. med. Sc. Trans. IV Pharm.*, 1930, p. 70, cité par Lévy (J.) [51].
[4] Asakura (L.). *Fol. Pharm. Jap.*, **17**, 1933, p. 9.
[5] La Barre (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **94**, 1926, p. 1021.
[6] Barsoum (G. S.) et Gaddum (J. H.). *Journ. of Phys.*, **85**, 1935, p. 1
[7] Bartosch (R.), Feldberg (W.) et Nagel (E.). *Pflüger's Arch.*, **231**, 1932-1933, p. 616.

[8] Bernheim (F.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **42**, 1931, p. 441.
[9] Best (C. H.). *Journ. of Physiol.*, **67**, 1929, p. 256.
[10] Binet (L.) et Marquis (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1285.
[11] Bovet (D.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 1020.
[12] Bovet (D.) et Maderni (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 980.
[13] Bovet (D.), Lestrange (Y. de) et Fourneau (J. P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 1192.
[14] Bovet (D.), Trefouël (J.), Sterne (J.) et Strikler (H.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 29.
[15] Busson (B.) et Kirschbaum (P.). *Centrbl. f. Bakt.* (Origin.), **65**, 1912, p. 507.
[16] Clark (A. J.). General pharmacology. Handbuch der exp. Pharm. Vierter Band J. Springer, Berlin, 1937.
[17] Code (C. F.). *Journ. of Phys.*, **89**, 1937, p. 257.
[18] Code (C. F.). *Journ. of Phys.*, **90**, 1937, p. 501.
[19] Cordier (D.) et Magne (H.). *Ann. de Physiologie*, **3**, 1927, p. 486.
[20] Cornil (L.) et Malmejac (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 680.
[21] Dale (H. H.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **4**, 1913, p. 167.
[22] Dale (H. H.), Bauer (W.) et Richards (W.). *Lancet*, **216**, 1929, p. 1179.
[23] Dale (H. H.) et Laidlaw (P. P.). *Journ. of Phys.*, **41**, 1910-1911, p 318.
[24] Dale (H. H.) et Laidlaw (P. P.). *Journ. of Phys.*, **43**, 1912, p. 182.
[25] Daly (I. de Burgh), Peat (S.) et Schild (H.). *Quart. J. of exp. Phys.*, **25**, 1935, p 33.
[26] Daly (I. de Burgh) et Schild (H.). *Journ. of Phys.*, **83**, 1934-1935, p. 3.
[27] Dicker (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 341.
[28] Eldbacher (S.) et Zeller (A.). *Helv. chim. Acta.* **20**, 1937, p. 717.
[29] Erlenmeyer (H.) et Berger (E.). *Biol. Zeit.*, **252**, 1932, p. 22.
[30] Feldberg (W.). *Revue de Pharm. et Thérap. exptle*, **2**, 1933, p. 311.
[31] Feldberg (W.) et Schilf (E.). Histamin, seine Pharmakologie und Bedeutung für die Humoralphysiologie. J. Springer, Berlin, 1930.
[32] Feldberg (W.) et Schilf (E.). Histamin. J. Springer, Berlin, 1930, p. 339.
[33] Feldberg (W) et Schilf (E.). Histamin. J. Springer, Berlin, 1930, p. 175.
[34] Fierens (B.) et de Nayer (P. P) *C. R. Soc. de Biol*, **122**, 1926, p. 805.
[35] Fromherz (K.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm*, **173**, 1933, p. 86.
[36] Fuji. *Journ. Biophysics*, **1**, 1924, p. 42, cité d'après Feldberg et Schilf [31], p. 209.
[37] Fujikawa (J.). *Jap. Journ. Med. Sc. IV Pharm.*, **11**, 1938, p. 17 ; *Chem. Abstr.*, **32**, 1938, p. 8582.
[38] Gajdos. *Paris Médic.*, **46**, 1938, p. 509.
[39] Guggenheim (M.) et Löffler (W.). *Biochem. Zeit.*, **72**, 1916, p 303.
[40] Guillot (M.) et Ong Siam Gwan. *C. R. Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 318.
[41] Halpern (B. N.). *C. R. Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 678.
[42] Hanke (N. T.) et Koessler (K. K.). *Journ. of biol. Chem.*, **59**, 1924, p. 879.

[43] HASHIMOTO (H.). *Arch. int. Med.*, **35**, 1925, p. 609, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 338.

[44] KEETON (R. W.), LUCKARDT (R. B.) et KOCH (F. C.). *Am. Journ. of Physiol.*, **51**, 1920, p. 469.

[45] KLISIECKI (A.) et HOLOBUT (W.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **186**, 1937, p. 57.

[46] KOSKOWSKI (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 509.

[47] KRISHNAN (B. T.). *Ind. Journ. of med. Research*, **25**, 1937, p. 95.

[48] LAMSON (R. W.). *Proc. Soc. expt. Biol. a. Med.*, **26**, 1928, p. 612.

[49] LEE (P. H.) et KIM (M. S.). *J. Severance Union Med. Coll.*, **3**, 1937, p. 74.

[50] LESCHKE (E.). *Zeit. f. expt. Path. u. Ther.*, **14**, 1919, p. 151.

[51] LÉVY (J.). *Paris Méd.*, n° 29, 1935, p. 67.

[52] LÉVY (J.) et DITZ (E.). *Arch. int. de Pharm. et Therap.*, **47**, 1934, p 138.

[53] LISSAK (K.) et HODES (B. R.). *Am. Journ. of Phys.*, **124**, 1938, p. 637

[54] MACKAY (M. E.). *Am. Journ of Phys.*, **95**, 1930, p. 527.

[55] MAEDA (T.). *Fol. pharm. Jap.*, **18**, 1933, p. 79.

[56] MANWARING (W. H.). *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **21**, 1910, p. 275.

[57] MANWARING (W. H.), OSEPIAN (V. M.), O'NEIL (P. L.) et MOY (H. B.). *Journ. of Imm.*, **10**, 1925, p. 575.

[58] MARCOU (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 573.

[59] MOGENA (H. G.) et FERNANDEZ (A. L.). *Arch. Verdgskrkh*, **42**, 1922, p. 104, cité d'après FELDBERG et SCHILF [30], p. 336.

[60] MOLINARI-TOSATTI (P.). *Boll. Soc. Biol. sper.*, **3**, 1929, p. 928, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 154.

[61] MORRISON (R. S.) et LISSAK (K.). *Am. Journ. of Phys.*, **123**, 1938, p. 404.

[62] OKASAKI (L.). *Jap. Journ. of med. Sc* , **6**, 1931, p. 133.

[63] PAL (J.). *Dtsch. med. Woch.*, 1912, p. 1774.

[64] POPIELSKI (L.). *Pflüger's Arch.*, **178**, 1920, p. 214.

[65] RESCHAD (S. G.). *Arch. f. expt. Path. u. Pharm.*, **188**, 1938, p. 247.

[66] RIGLER (R.). *Münch. med. Woch.*, **83**, 1936, p. 15.

[67] SCHMIDT (G. W.) et STAHELIN (Ad.). *Ztschr. f. Imm. forsch.*, **60**, 1929, p. 222.

[68] SIMON (A.) et STAUB (A. M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 815

[69] SOHIER (R.). Les caustiques vésicants. Vigot frères, Paris, 1939.

[70] SOLLMANN (T.) et PILCHER (J. D.). *Journ. of Pharm. a exp. Therap.*, **9**, 1917, p. 309.

[71] SOLLMANN (T.) et von OETTIGEN (W. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **25**, 1928, p. 692.

[72] SPINELLI (A.). *Soc. intern. di micr. Boll. dell. sez. ital.*, **4**, 1932, p. 257.

[73] SPOR. Diss. Breslau (1920), cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 336.

[74] STARLING (E. H.). *Proc. roy. Soc. Med.*, **7**, 1914, p. 29 (therap.).

[75] SUGIMOTO (I.). *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **74**, 1913, p. 27.

[76] SZAKALL (A.). *Arch. f. Path. u. Pharm.*, **148**, 1930, p. 218.

[77] TAKEBAYASHI (H.). *Zeit. f. Chirurg.*, **249**, 1937, p. 256.

[78] TAINTER (M. L.), PEDDEN (A. R.) et JAMES (M.). *Journ. of Pharm a. exp. Therap.*, **31**, 1934, p. 371.

[79] THORNTON (J. W.). *Quart. Journ. exp. Phys.*, **21**, 1932, p. 305.
[80] TINEL (J.), UNGAR (G.) et ZERLING (M. R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, p. 1150.
[81] UNGAR (G.). *Journ. de Phys. Path. gén.*, **34**, 1936, p. 77.
[82] UNGAR (G.) et PARROT (J.-L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **123**, 1936, p. 676.
[83] UNGAR (G.) et PARROT (J.-L.). *Ann. de Phys.*, **13**, 1937, p. 939.
[84] UNGAR (G.), PARROT (J.-L.) et BOVET (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 445.
[85] UNGAR (G.), PARROT (J.-L.) et LEVILLAIN (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, p. 1015.
[86] VANYSEK (Fr.). *Biol. Zeit.*, **67**, 1914, p. 221.
[87] VIOTTI (C.). *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 1085.
[88] WARNANT (H.). *Arch. int. de Pharm. et Therap.*, **37**, 1930, p. 61.
[89] WEBER (E.). *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1914, p. 63.
[90] WEBSTER (M. D.). *Journ. of Pharm. a. exp. Therap.*, **53**, 1935, p. 340.
[91] WEISS (S.), ELLIS (L. B.) et ROBB (G. P.). *Ann. Journ. Phys.*, **90**, 1929, p. 551.
[92] YAMAUCHI (M.). *Arb. med. Univers. Okayama*, **1**, 1928, p. 14, cité par FELDBERG et SCHILF [31], p. 186.

Le Gérant : G. MASSON.

Imprimé par l'Ancne Imple de la Cour d'Appel, A. MARETHEUX, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France).

T. 63 DÉCEMBRE 1939 N° 6

ANNALES

DE

L'INISTTUT PASTEUR

AUGUSTE PETTIT

1869-1939

Auguste Pettit s'est éteint brusquement le 11 octobre dernier. Sa vie a été entièrement consacrée à la recherche scientifique et il a réalisé l'idéal de travail qu'il s'était proposé dès sa jeunesse.

Au lycée, A. Pettit s'intéressa aux sciences, puis à l'étude des insectes ; ce qui était un simple passe-temps le conduisit à la préparation d'une licence de sciences naturelles en Sorbonne. C'est au Muséum d'Histoire Naturelle qu'il commença sa carrière scientifique et s'orienta vers l'histologie.

Chef de travaux pratiques, stagiaire, préparateur auprès de la chaire d'anatomie comparée, il eut pour premiers maîtres des biologistes et des naturalistes : G. Pouchet, H. Filhol, Ed. Perrier, mais c'est Pouchet qui le forma à la méthode scientifique. De cette période datent, en 1891, son voyage d'études en Allemagne où il travailla dans les laboratoires de C. Wei-

gert, de P. Ehrlich, de W. Fleming et, l'année suivante, la participation à la mission de « La Manche » au Spitzberg et à l'île Jan Mayen. Il fréquente les laboratoires de Balbiani, Dastre, Mathias Duval. C'est aussi pendant son séjour au Muséum qu'il prépare sa thèse de doctorat ès Sciences naturelles sur les capsules surrénales (1896), premier mémoire qui lui donne un rang parmi les chercheurs.

Il s'inscrit à la Faculté de Médecine où, en raison de ses connaissances en histologie il est préparateur en 1893, chef de laboratoire du Prof. Le Dentu de la Clinique chirurgicale de l'Hôpital Necker, puis de l'Hôtel-Dieu ; à partir de 1899, chef de laboratoire du Prof. Albarran à la Clinique des maladies des voies urinaires jusqu'en 1908. Il est docteur en médecine depuis huit ans, après la présentation d'une thèse sur le diagnostic des cancers utérins, quand il vient à l'Institut Pasteur d'abord comme chef de laboratoire de Laveran, puis, quelques années après, de Louis Martin : c'est-à-dire que pendant plus de trente ans il se consacre à l'œuvre pastorienne.

Il aimait enseigner et il apprit l'histologie normale et pathologique à plusieurs générations de chercheurs et d'internes des hôpitaux. Il enseigna au Muséum, dans les laboratoires hospitaliers où il travailla, à l'Institut Pasteur. En Sorbonne, il assura l'enseignement de l'histologie comparée pendant cinq années. A plusieurs reprises il fut chargé de missions à l'étranger : missions d'enseignement en Espagne et au Portugal, mission d'organisation au Canada, mission d'étude au Sénégal

En 1936, sentant ses forces diminuer, il avait spontanément demandé à prendre sa retraite.

L'œuvre scientifique d'Auguste Pettit s'étend sur des domaines variés et porte dans chacun l'empreinte de sa double formation de naturaliste et de médecin. Dès les premières années de sa vie scientifique il comprit « l'influence favorable qu'exercent réciproquement l'une sur l'autre la médecine et l'anatomie générale et cela par deux moyens différents : soit par la constatation de faits qui sont une source d'informations nouvelles, soit par des techniques qui, transposées d'une dis-

cipline à l'autre en accroissent le pouvoir de pénétration ». C'est dans cet esprit que furent accomplies ses recherches sur l'immunité, sur les réactions cellulaires provoquées par des micro-organismes, des toxines, des lipoïdes, des toxalbumines. S'il étudie les coccidies, les hémogrégarines, un *Ichtyosporidium*, les *Leishmania*, les trypanosomes, il s'attache moins à l'étude du parasite qu'à ses rapports avec les tissus et aux lésions de la cellule, aux produits nocifs sécrétés par les parasites ; s'il recherche l'action des toxines diphtériques, de sérums de Murénides sur l'organisme, il voit la rapidité de l'atteinte du cytoplasme et la série des altérations nucléaires.

Il étudia les tumeurs malignes des animaux sauvages à une époque où l'histologie pathologique comparée était à peu près ignorée. Dans ses travaux sur le diagnostic histologique des curettages utérins, sur la leucoplasie où il vit un mécanisme de dégénérescence néoplasique, il est guidé par la conception physiologique, ce qui constitue la principale originalité de sa thèse de médecine publiée à une époque où le point de vue descriptif était seul envisagé en anatomie et en histologie pathologique.

Ses études sur les surrénales, sur les plexus choroïdes sont basées sur les mêmes conceptions générales. Il découvrit la nature glandulaire des surrénales, des plexus choroïdes en reliant les données anatomiques aux processus découverts par les physiologistes. Ayant fait de la « morphologie microscopique une physiologie cellulaire », il fut conduit à des recherches d'histologie pathologique expérimentale et c'est la néphrite, la cirrhose qu'il étudia chez le lapin, suivant le régime alimentaire.

L'étude d'une maladie infectieuse, c'est en anatomo-pathologiste qu'il l'aborde, puis il met en œuvre toutes les autres ressources pastoriennes. Ce qui le préoccupe en premier lieu, c'est la recherche des lésions créées par le parasite, visible ou invisible ; l'isolement du parasite, la reproduction expérimentale des lésions, puis les propriétés des humeurs des animaux atteints de la maladie spontanée ou acquise, où il retrouve dans un anticorps la spécificité du parasite ; ces notions le conduisent à la mise au point d'un diagnostic sérologique, à la préparation de sérums thérapeutiques. Ce pro-

gramme, A. Pettit l'a réalisé en totalité pour la spirochétose ictérohémorragique, en partie seulement pour la fièvre jaune et la poliomyélite.

Pour la spirochétose ictérohémorragique il a fait une étude complète de la maladie humaine et de l'infection du cobaye, une étude approfondie du spirochète ; il a préparé un sérum thérapeutique avec le cheval, auquel il inoculait des émulsions de foie de cobaye ictérique riches en spirochètes avant de connaître la culture. L'apparition des agglutinines dans le sang du malade lui permit de faire le sérodiagnostic de la maladie. La pratique du sérodiagnostic, poursuivie depuis plus de vingt ans, a singulièrement élargi le cadre de cette maladie.

L'histoire de la spirochétose ictérohémorragique, où ses travaux tiennent une très large place, il l'exposa en un volume publié avec la collaboration de L. Martin, puis, en deux livres qu'il présenta seul, il donna la somme des connaissances sur les spirochétidés.

Pour la fièvre jaune, il apporta une large contribution à l'étude de la maladie expérimentale du singe ; il prépara, en inoculant au cheval le foie du singe malade, un sérum antiamaril qui, avant la découverte de la culture du virus, a servi aux adeptes de la séro-vaccination pour l'immunisation contre cette infection.

Il ne connaissait pas le microbe de la poliomyélite et, après beaucoup d'autres, il n'a pas réussi à l'isoler, mais avec la moelle du singe atteint de l'infection expérimentale, où l'intensité des lésions laisse supposer la présence du virus invisible, il inocula d'abord un mouton, puis un poney, puis des chevaux : le sérum neutralisait le virus (1918), pouvait arrêter le cours de l'infection. Pendant seize ans il attendit l'heure de montrer la valeur du sérum. De nombreuses observations avaient été publiées : en un modeste volume il groupa les faits expérimentaux et les observations qui donnent toute la valeur à sa découverte au double point de vue scientifique et social.

A. Pettit étendit son activité, en dehors des établissements scientifiques, aux Sociétés savantes dont il était membre. Il

fut élu à l'Académie de Médecine en 1925. La Société de Biologie, dont il devint membre dès 1898, secrétaire général pendant dix-sept ans, lui doit d'avoir continué et élargi l'œuvre de Gley. Il groupa autour de la Société-mère plus de 20 filiales françaises et étrangères, permettant ainsi une diffusion mondiale des sciences biologiques françaises, faisant des Comptes rendus de la Société un instrument de travail nécessaire à tous les chercheurs, tant devint vaste le domaine embrassé par les communications publiées. C'est à lui aussi que l'on doit la publication des tables générales de la Société de Biologie : table cinquantenale et tables du 75e anniversaire.

Auprès d'un tel Maître, la vie au laboratoire était extrêmement active ; il aimait l'ordre, la rapidité et la précision dans le travail parce qu'il possédait lui-même ces qualités à un très haut degré. Quand une expérience était décidée, il en discutait les détails, rien ne devait être négligé et c'est quand tout était prévu qu'il autorisait à commencer les recherches. Très habile pour toutes les opérations sur l'animal, il était aussi extrêmement adroit pour construire l'appareil nécessaire à telle ou telle intervention spéciale et son activité industrieuse a permis maintes fois de mener à bien des recherches qui n'auraient pu être entreprises sans un appareil de contention, un support, adaptés spécialement au but proposé.

Les travailleurs étaient toujours nombreux autour de lui. Il ne se bornait pas seulement à surveiller et à diriger au laboratoire les recherches de ses élèves, il s'intéressait à leurs habitudes, à leurs goûts ; aux étrangers il traçait des itinéraires de vacances en France, indiquait les livres français à lire, il les invitait chez lui. Ceux qui étaient momentanément loin de leur famille trouvaient auprès de lui une sympathie toute paternelle.

Plusieurs de ses anciens élèves ont acquis un grand nom dans la science ou dans la médecine : tous lui ont voué une reconnaissance, une affection qui s'étendent, au delà du Maître, à tout l'Institut Pasteur. Si beaucoup de savants étrangers ont appris à aimer la France et à la connaître, c'est à A. Pettit qu'ils le doivent

Le temps qui n'était pas pris par son activité scientifique,

A. Pettit le consacrait à la musique en compagnie de sa sœur et de quelques amis qui étaient, pour la plupart, d'anciens élèves.

Sa sœur fut pour lui tout son foyer pendant les bons et mauvais jours ; elle était sa secrétaire vigilante, elle n'hésita pas à le suivre quand il partit en mission au Sénégal. La mort de son frère est pour elle un véritable déchirement. Que Mlle Pettit veuille bien trouver ici l'expression de la sympathie de tous les pastoriens.

L'Institut Pasteur salue la mémoire de celui qui vient de disparaître : les élèves d'Auguste Pettit continueront l'œuvre de leur Maître.

B. Kolochine Erber.

LE PROBLÈME DE LA VIRULENCE DU BACILLE DE KOCH (1)

par ALFRED BOQUET.

(*Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose.*)

Dans son acception la plus ancienne, le terme de virulence exprimait l'aptitude des principes des affections transmissibles à engendrer des troubles morbides chez l'homme et chez les animaux.

Au début de l'ère pastorienne, il apparaissait avec évidence que cette aptitude était liée à la rapidité et à l'intensité avec lesquelles les germes responsables des maladies infectieuses se multiplient dans les humeurs et les tissus, en altérant leur composition et leur texture, leurs propriétés et leurs fonctions. Bref, la notion de virulence se superposait à la notion de parasitisme, mais elle traduisait avec plus de force et de précision, le rôle perturbateur de l'élément microbien.

Une première restriction fut apportée à cette définition par la découverte des toxines, qui permettait de séparer, dans les divers modes d'activité pathogène des bactéries, ce qui relève uniquement des poisons solubles qu'elles émettent là où elles ont réussi à s'implanter. Et l'on insista sur la distinction à introduire dans la pathologie générale, entre les toxi-infections provoquées par les germes toxigènes et les infections pures, dont la tuberculose semblait représenter les types subaigu et chronique les plus parfaits.

Toutefois, il était difficile d'admettre sans contrôle que les microbes pathogènes essentiellement virulents, c'est-à-dire non producteurs de toxines, interviennent dans le développement des maladies par les seuls effets de leur pullulation et des désordres qu'ils peuvent déterminer en se multipliant dans

(1) Ce rapport devait être communiqué le 18 septembre 1939 à la XI^e Conférence internationale de la tuberculose, à Berlin.

le sang, la lymphe et les organes, ou par la spoliation de substances indispensables à l'activité physiologique des tissus.

On convint alors — et la preuve en fut donnée pour maintes d'entre elles —, que les bactéries non toxigènes étaient capables de diffuser des diastases nocives et des substances toxiques, les endotoxines liées à leur protoplasma. Sous cet angle et de cette façon indirecte, le problème de l'infection microbienne se ramenait encore au problème général des intoxications.

Puis, nos connaissances sur l'immunité et sur l'allergie ayant été développées, on s'avisa que l'organisme infecté pouvait, après une période d'invasion plus ou moins longue, modifier de lui-même le cours et l'allure de la maladie dont il souffrait, non seulement en faisant intervenir ses cellules phagocytaires et les anticorps spécifiques acquis durant ce stade prémonitoire, mais aussi en répondant par des réactions inflammatoires, violentes et brèves, aux nouvelles poussées envahissantes et aux substances, haptènes ou antigènes, que les éléments infectieux libèrent dans les foyers.

Aucune maladie contagieuse ne représente mieux que la tuberculose ce type d'infection à la fois immunisante et allergisante. De sorte que, si nous définissons la virulence du bacille de Koch par la puissance de sa végétation *in vivo*, la rapidité et l'abondance avec lesquelles il se dissémine de proche en proche et à distance, la multiplicité et la gravité des lésions qu'il produit, son extraordinaire vitalité au sein des tissus altérés, nous devrons cependant examiner dans quelle mesure les modifications immunologiques créées par l'imprégnation bacillaire entraînent des conditions plus défavorables ou plus propices à la multiplication des germes spécifiques.

La distinction entre les deux types de bacilles des mammifères étant principalement fondée sur les différences de leur virulence à l'égard de certaines espèces, il convient, avant tout, de préciser pour chacun d'eux le champ de leur activité pathogène. Fort heureusement, la nature fournit aux expérimentateurs des animaux doués d'une telle sensibilité à l'infection tuberculeuse que leur emploi, dans des conditions bien définies, permet de négliger l'influence éventuelle des fluctuations immunitaires sur les propriétés pathogènes des germes

inoculés. Il est donc relativement facile de comparer la virulence des souches humaines et des souches bovines entre elles et d'en déterminer la valeur avec toute l'exactitude souhaitable.

DÉTERMINATION DE LA VIRULENCE SPÉCIFIQUE DES BACILLES HUMAINS ET DES BACILLES BOVINS.

Sans doute, dans la très grande majorité des cas, l'inoculation intraveineuse au lapin, à la dose canonique de 0 milligr. 01 (Oehlecker, W. Park et C. Krumwiede), l'inoculation sous-cutanée préconisée par A. S. Griffith, l'inoculation intradermique d'après la méthode de Bruno Lange et Tadao Toda, l'inoculation intraméningée que j'ai employée selon le procédé de Louis Martin, assurent-elles, avec le maximum de certitude, le diagnostic de l'espèce ou du type bacillaire.

Sans doute aussi, le contrôle par les caractères des cultures initiales sur les milieux à l'œuf ou au sérum, glycérinés et non glycérinés, et les subcultures sur la pomme de terre ajoute-t-il encore à cette recherche de précieux éléments d'information. Cependant, surtout lorsqu'il s'agit de souches déjà anciennes, il est parfois malaisé de faire la distinction entre une variante eugonique et rugueuse de bacilles bovins affaiblis dans leurs propriétés pathogènes et certains bacilles humains anormalement virulents pour le lapin. L'inoculation au cobaye, en montrant que l'atténuation des premiers se manifeste également chez les animaux de cette espèce et qu'elle contraste alors avec l'hypervirulence des seconds dans les mêmes circonstances, donne évidemment des présomptions dont il faut tenir compte ; néanmoins, à défaut d'épreuve sur les bovidés, qui d'ailleurs pourrait ne pas être plus probante, il semble que c'est à l'inoculation intraméningée qu'on doive s'adresser pour déceler chez de tels germes, les derniers reliquats de leur virulence spécifique.

Il est, en effet, exceptionnel qu'un bacille humain, si pathogène qu'il apparaisse en inoculation intraveineuse, provoque chez le lapin des symptômes de méningite à une dose inférieure à 0 milligr. 001. Au contraire, un bacille bovin relativement peu virulent, comme la souche de Vallée, dont l'inoculation intraveineuse au lapin, à la dose de 0 milligr. 01, ne

provoque plus, depuis plusieurs années, que des lésions pulmonaires et rénales lentement progressives, détermine encore l'évolution d'une méningo-encéphalite mortelle vers le vingtième jour après l'inoculation sous-occipitale d'une dose de 0 milligr. 01, vers le cinquantième jour après l'inoculation d'une dose de 0 milligr. 00005 par la même voie.

Les recherches de Bruno Lange et celles que viennent d'effectuer N. et L. Stamatin, montrent que l'emploi de la souris blanche et du rat blanc n'offre aucun avantage sur l'inoculation au lapin pour la détermination et la mesure des propriétés pathogènes spécifiques.

Quant aux bacilles complètement dégradés, ou presque, comme ceux que l'on rencontre dans certaines lésions lupiques ou parmi les vieilles souches de laboratoire, aucun procédé d'inoculation ne permet d'en diagnostiquer le type. Je reviendrai tout à l'heure sur la question de savoir si leur virulence est définitivement éteinte ou si elle peut être ranimée par des artifices de culture ou d'inoculation.

Mesure de la virulence.

En principe, la mesure de la virulence d'une souche humaine ou bovine consiste à déterminer la dose minima de bacilles capables de produire une tuberculose mortelle chez l'animal sensible aux deux types, c'est-à-dire chez le cobaye.

Les règles qui doivent être observées pour le prélèvement des cultures au maximum de leur vitalité, la préparation des suspensions microbiennes, le choix des animaux et l'inoculation elle-même vous sont trop connues par les travaux de A. Calmette, A. S. Griffith, Bruno Lange, K. A. Jensen, G. S. Wilson et d'autres, pour que je me permette de les exposer ici. Je me bornerai à indiquer mes préférences pour la voie sous-cutanée chez le cobaye, pour la voie sous-occipitale, contrôlée au besoin par la voie veineuse, chez le lapin.

On a proposé, pour le titrage de la virulence, de substituer à la recherche de la dose minima tuberculigène, la mesure de la gravité des lésions, pulmonaires en particulier, produites en un temps donné par l'inoculation de quantités déterminées

de bacilles. Dans ce dessein, Etienne Burnet employait des doses variant de 0 milligr. 25 à 0 milligr. 001 et sacrifiait ses cobayes huit à dix semaines plus tard.

Afin d'éviter que leurs expériences ne fussent troublées par la présence de bacilles morts dans les cultures dont ils étudiaient la virulence, A. Bergeron et M[lle] B. Mézières ont même inoculé systématiquement, d'emblée, une dose très élevée de culture, 0 milligr. 2. Mais, sauf lorsqu'il s'agit de bacilles isolés de lésions tuberculeuses de la peau, les différences d'activité des souches, mesurées d'après la rapidité avec laquelle elles se dispersent dans l'organisme du cobaye et créent des lésions viscérales, sont généralement si peu accusées, quand on utilise des doses supérieures au 1/100 ou au 1/1.000 de milligramme qu'il est préférable, croyons-nous, de procéder à la détermination de la dose minima infectante sur un lot important de cobayes, en tenant compte naturellement, pour chaque dose, de l'étendue des lésions obtenues chez les animaux sacrifiés après des délais donnés, ou du temps écoulé entre l'inoculation infectante et la mort par généralisation.

En ce qui concerne les souches pleinement virulentes, le contrôle par la culture, tel qu'il a été institué par B Lange. montre qu'un seul bacille vivant suffit pour créer des lésions tuberculeuses chez le cobaye. Quand on opère toujours de façon identique, avec des cultures de même âge, entretenues dans les mêmes conditions, sur les mêmes milieux, il y a donc peu de chance pour que les résultats des titrages soient sérieusement faussés par la présence d'une proportion variable de bacilles morts jusque dans les plus faibles dilutions inoculées.

Pour la plupart des souches, il suffit d'inoculer au cobaye, par voie sous-cutanée, des doses décroissant depuis 0 milligr. 01 jusqu'à 0 milligr. 000.000.001. Lorsque l'examen des ganglions et les épreuves tuberculiniques montrent que les plus fortes doses sont inopérantes après six à huit semaines, ce qui est exceptionnel, sauf pour les bacilles des lésions lupiques, on complète le titrage par l'inoculation de doses allant de 0 milligr 1 à 10 milligrammes. Si l'on adopte la voie veineuse chez le lapin, on ne doit pas oublier qu'à partir de cette dernière dose, même pour le BCG, les effets toxiques de

la masse microbienne accumulée dans les organes, sont susceptibles de déterminer, surtout dans les poumons, de graves désordres entraînant la mort en deux à trois semaines, sans que la virulence de la souche soit réellement en cause.

Variations naturelles de la virulence.

Les changements morphologiques, structuraux, biochimiques et fonctionnels que les facteurs externes impriment aux êtres vivants sont d'autant plus profonds et plus stables que les espèces intéressées présentent une organisation moins complexe et que les individus se régénèrent plus rapidement dans le milieu modifié. Il est donc facile de prévoir que des germes aussi rudimentaires que les bactéries, réduits à une unique cellule, doivent se prêter à des variations très étendues quand l'influence perturbatrice se prolonge en s'aggravant pendant un très grand nombre de générations. D'aucuns n'ont pas hésité à en inférer que ces changements peuvent déborder les limites, assez mal définies d'ailleurs, de la variété et même de l'espèce, et revêtir ainsi l'aspect de véritables mutations.

L'immense population bacillaire qui se développe dans un organisme au cours d'une infection aussi lentement évolutive que la tuberculose, a souvent pour origine des éléments de provenance diverse, issus de contaminations répétées au contact d'individus différents de la même espèce ou même d'une autre espèce De ce fait, les souches dites pures, isolées d'un malade, ne sont en réalité qu'un mélange dont on doit pouvoir séparer, par les méthodes usuelles, soit des bacilles du type humain différenciables par leur activité pathogène, soit, mais beaucoup plus rarement, des bacilles bovins, voire des bacilles aviaires, associés à des bacilles humains.

Il est, en outre, parfaitement légitime d'admettre, d'après les faits acquis sur la variabilité microbienne, que, même si la tuberculose était produite par un seul bacille, qui se multiplierait à l'infini dans la suite, et que son évolution se poursuive en dehors de toute surinfection exogène, les éléments pris isolément dans cette lignée apparemment pure, se distingueraient encore les uns des autres par divers caractères plus

ou moins accentués, et synthétisés en quelque sorte dans leur virulence.

A vrai dire, ces variations n'apparaissent pas quand on opère avec des masses de bacilles provenant de crachats ou d'autres produits pathologiques dont l'inoculation aux animaux met seulement en évidence les activités conjuguées des bacilles les plus vigoureux et les plus virulents, et c'est sans doute pour cette raison que les résultats globaux ainsi obtenus ne décèlent généralement que de faibles différences dans le pouvoir pathogène des souches du même type.

Mais il en serait tout autrement, comme le prouvent les observations de K A. Jensen et de ses collaborateurs, si, à partir des produits contaminés, on effectuait les ensemencements et les inoculations avec des suspensions bien homogènes et diluées graduellement jusqu'à l'unité. D'autre part, l'isolement des bacilles au moyen du micromanipulateur et l'étude des cultures fournies par ces éléments séparés dès l'origine permettraient de comparer l'influence qu'exercent respectivement les facteurs intrinsèques et les circonstances ambiantes sur la variabilité des germes dérivés d'une même souche.

La pratique du titrage des cultures d'isolement du même type montre qu'il existe, de l'une à l'autre, des différences que nous jugeons assez faibles, parce qu'elles correspondent, le plus souvent, à de simples déplacements de la virgule de 1, 2 ou tout au plus 3 rangs dans la série des décimales, autour du millionième de milligramme. Toutefois, ces écarts, bien qu'ils apparaissent déjà importants à l'échelle des bactéries, revêtent une autre ampleur quand on compare les souches humaines et bovines normales avec les bacilles que l'on isole des lésions lupiques de l'homme.

Toutes les constatations effectuées dans cet ordre de faits concordent parfaitement, depuis celles, déjà anciennes, de A. S. Griffith et de la Commision royale anglaise, de Weber et Taute, de Rothe et Bierotte, d'Et. Burnet, de Gosio, jusqu'aux récentes observations de B. Lange, Kirchner, M. Ledermann, K. A. Jensen et Frimodt-Möller, M^{lle} Bloch et Ducourtioux, Gernez, Crampon et Breton, Saenz, Brocard et Canetti. L'intérêt qu'elles présentent est d'autant plus vif

qu'elles conduisent toutes à cette conclusion que les modifications subies par les bacilles tuberculeux humains et bovins dans la peau de l'homme se traduisent par un amoindrissement de leurs propriétés pathogènes sans affecter cependant les caractères du type auxquels ils appartiennent.

Cette atténuation des bacilles tuberculeux dans le revêtement cutané peut même être si profonde que, tout en restant capables de végéter sur place, de maintenir en activité les foyers lupiques dont ils sont responsables, voire de les étendre, ils peuvent se montrer à peu près inoffensifs pour le cobaye et pour le lapin. J'examinerai tout à l'heure, à propos de la stabilité des souches atténuées, la question de savoir si les germes ainsi dégradés sont susceptibles de redevenir pathogènes et dans quelles conditions.

Le mécanisme de l'atténuation du bacille de Koch, dans les lésions lupiques, n'est pas encore élucidé, pour la raison majeure que tous les essais de reproduction expérimentale de cette forme si particulière de la tuberculose humaine ont jusqu'à présent échoué. D'ailleurs les localisations cutanées de l'infection bacillaire sont assez peu fréquentes chez les animaux, et celles qui surviennent spontanément n'offrent ni la variété clinique, ni l'intérêt pathogénique qu'elles présentent chez l'homme, à moins qu'on ne parvienne un jour à identifier à des bacilles dégradés des mammifères ou des oiseaux, les germes acido-résistants difficilement cultivables ou totalement rebelles à la culture et non inoculables, que l'on observe dans certaines lésions tégumentaires, ulcéreuses et pyogènes des bovidés.

L'hypothèse d'une inoculation directe de la peau par des germes de faible activité pathogène, à laquelle s'était rallié I. Straus pour expliquer la genèse des lésions lupiques, est maintenant abandonnée, et tous les auteurs tendent à admettre que le lupus relève d'une localisation de bacilles virulents à l'origine et véhiculés par la voie sanguine à partir d'un foyer souvent méconnu.

C'est A. S. Griffith qui a fourni la preuve que l'atténuation de ces germes s'effectue au sein même des lésions où ils se développent. Dans 5 cas de lupus qu'il a pu suivre pendant plusieurs années, notre savant collègue a, en effet, isolé en

premier lieu des bacilles bovins pleinement virulents, puis, après des délais allant de treize mois à sept ans et demi, il n'a plus retrouvé dans les mêmes lésions que des bacilles bovins affaiblis. Cette dégradation des propriétés pathogènes ne va pas de pair avec la durée de la maladie. D'autre part, elle peut s'effectuer assez rapidement, car A. S. Griffith a décelé des bacilles nettement atténués dans des lésions lupiques jeunes, ne datant que de trois à six mois. Bruno Lange a fait des constatations analogues dans un cas de lupus à bacilles humains évoluant depuis une année ; en outre, il a isolé un bacille humain très virulent de lésions lupiques datant de quarante-deux ans.

Des souches de bacilles humains ou bovins dont la virulence était anormalement faible ont été rencontrées également chez l'homme et chez les animaux dans d'autres formes de la tuberculose : lésions articulaires et osseuses, adénites du porc, lésions viscérales du cheval, mais il est incontestable que c'est la peau de l'homme, surtout la peau nue, qui se prête le mieux à l'atténuation du bacille de Koch.

L'idée a été émise et longtemps discutée que le contact direct des bacilles du lupus avec l'oxygène de l'air et leur exposition à la lumière, dans une ambiance sujette à des variations thermiques étendues, pouvaient entraîner une diminution graduelle de leur virulence ; mais aucune preuve n'est venue confirmer cette opinion. Il ressort, au contraire, d'un grand nombre d'expériences, en particulier de celles de P. Chaussé (1912) et d'Etienne Burnet (1915) que si les bacilles tuberculeux résistent relativement peu *in vitro* à l'action de la lumière solaire et même de la lumière diffuse, les effets nocifs des ondes lumineuses portent non sur leurs aptitudes parasitaires et pathogènes, mais sur leur vitalité.

Au reste, nul n'a pu obtenir jusqu'à présent, chez les grands animaux et chez les rongeurs de laboratoire, un réel affaiblissement de la virulence des bacilles tuberculeux dans les lésions cutanées provoquées par une inoculation intradermique de souches humaines ou bovines ; et tous les essais effectués dans la même intention en inoculant en série des bacilles des mammifères à des animaux à sang froid (A. S. Griffith) ont également échoué. De sorte que, tenant compte de l'inégale

activité des diverses souches isolées de lésions lupiques, depuis les plus pathogènes, qui sont du type humain normal, jusqu'aux plus dégradées, qui sont presque inoffensives pour le cobaye, c'est dans le milieu humoral et cellulaire où les bacilles végètent que nous devons chercher la cause de cette singulière dégradation. Pour A. S. Griffith, celle-ci résulte d'une interaction entre les bacilles et les forces défensives de l'organisme. J'incline à penser qu'elle est liée à l'intervention continue, mais d'intensité variable, selon les individus et le siège des lésions, de facteurs bio-chimiques locaux. Les processus physiologiques responsables de l'atténuation se rapprocheraient ainsi de ceux qui président *in vitro* à l'extinction graduelle des propriétés pathogènes des bacilles, par exemple dans les cultures sur pomme de terre biliée.

La plupart des souches de bacilles tuberculeux, quand elles sont régulièrement entretenues dans des milieux convenables, gardent très longtemps leurs qualités originelles. Cependant une expérience de plus de vingt ans avec la souche bovine de Vallée m'a montré que, sous des influences indéterminées, des bacilles dont la virulence paraissait stabilisée, peuvent faiblir peu à peu. Pour la souche de Vallée, cet affaiblissement qui semble avoir débuté il y a sept ans, est actuellement un peu plus marqué pour le lapin que pour le cobaye : une dose de 0 milligr. 01 inoculée par voie veineuse ne provoque chez le premier que des lésions pulmonaires et rénales lentement évolutives, une dose de 0 milligr. 000.001, inoculée sous la peau, tue encore le second par tuberculose généralisée en cinq à six mois.

En d'autres cas, comme pour la souche R_1 de Trudeau, la virulence, d'abord normale, baisse assez brusquement, puis, un certain niveau ayant été atteint, correspondant, sauf si l'on emploie des doses massives par voie veineuse ou trachéale, à la disparition presque complète de leur faculté de produire des lésions éloignées extensives, les germes reprennent en quelque sorte un nouvel équilibre physiologique et font preuve d'une grande stabilité.

Les souches humaines et bovines spontanément affaiblies au cours des passages sur les milieux artificiels, sont nombreuses

dans les laboratoires, mais le déterminisme de leur atténuation n'est pas encore élucidé. Récemment, K. C. Smithburn a étudié dans ce sens l'influence de l'acidité des milieux de culture et K. A. Jensen a signalé que les souches bovines entretenues sur des milieux glycérinés deviennent plus ou moins eugoniques et perdent une partie de leur activité pathogène.

Cette tendance que présentent les souches originellement lisses et dysgoniques à prendre l'aspect rugueux et le caractère eugonique des souches humaines est un des traits les plus marquants de leur variabilité et de leur aptitude à subir cette dissociation un peu particulière étudiée par K. A. Jensen et Frimodt-Möller au Danemark et par R. Laporte en France. L'avenir nous fixera sur le point de savoir si des différences se manifestent au cours du temps entre les variantes lisses et rugueuses dérivées de la même souche.

Dans le même ordre de faits, nous reppellerons que K. A. Jensen et J. Frimodt-Möller ont signalé que des bacilles bovins atypiques, d'origine humaine, peuvent donner naissance à plusieurs types de colonies secondaires, dont les éléments sont, les uns aussi atténués que le BCG, d'autres un peu plus pathogènes, d'autres enfin, aussi virulents pour le lapin et pour le cobaye que ceux de la culture d'origine.

Après les essais de F. Arloing et P. Courmont, qui ont abouti à la production du bacille dit homogène, de nombreuses tentatives ont été faites pour atténuer *in vitro* la virulence des bacilles tuberculeux. Nous en retiendrons seulement, parce que ce sont les plus démonstratives, celles qui ont permis à Calmette et Guérin d'obtenir la souche BCG dont l'affaiblissement est tel, qu'elle est incapable de produire un processus tuberculeux évolutif chez les animaux les plus sensibles. Vous savez avec quelle audace tranquille, quelle ténacité et quelle foi, M. Calmette a consacré les dernières années de sa vie à répandre la vaccination antituberculeuse au moyen du BCG chez les jeunes enfants, et je m'autorise du respect dont vous entourez sa mémoire pour lui apporter ici le témoignage de ma vénération.

Depuis 1919, j'ai essayé, sur la demande de M. Calmette, d'atténuer plusieurs souches humaines et bovines par le même

procédé de la culture en série sur pomme de terre biliée Après 60 passages, la souche bovine de Vallée par exemple, très virulente au départ, a cessé de produire des lésions viscérales évolutives chez le cobaye par voie sous-cutanée et chez le lapin par voie veineuse, à la dose de 0 milligr. 01, mais son action locale (abcès et adénite de voisinage) était alors plus marquée que celle du BCG en 1920 (230e passage). Dans la suite, son atténuation s'est poursuivie sans cependant atteindre celle du BCG. Actuellement, après 166 passages sur pomme de terre biliée, elle produit encore des lésions pulmonaires importantes chez le lapin lorsqu'on l'inocule à la dose de 10 milligrammes par voie veineuse.

Une souche humaine dite de Saranac, étudiée par M. Calmette, avec C. Guérin et L. Nègre, est devenue inoffensive pour le cobaye après 200 passages sur pomme de terre à la bile.

Enfin, la culture en série, sur des pommes de terre imprégnées d'une solution de sels biliaires à 1 p. 100, glycérinée à 5 p. 100, m'a également permis d'obtenir en soixante-dix mois une atténuation très sensible de la souche Vallée.

Stabilité des souches naturellement ou artificiellement atténuées.

La question de savoir si les souches naturellement ou artificiellement atténuées sont susceptibles de faire retour à la virulence standard a fait l'objet d'un très grand nombre de recherches, surtout depuis l'application du BCG à la prémunition de l'enfant.

Pour les souches bovines et humaines naturellement affaiblies *in vivo* dans les lésions lupiques, il apparaît à la lumière des travaux de A. S. Griffith et d'Et. Burnet, que certaines d'entre elles peuvent redevenir pathogènes quand on les inocule en série au cobaye, au lapin ou au bœuf. Mais je dois ajouter, d'après les constatations mêmes de Griffith et, plus récemment, de Jensen et d'autres auteurs, que les échecs sont plus nombreux que les réussites dans ce genre d'expériences.

En dépit de quelques apparences de succès obtenues dans des circonstances assez mal définies, il semble qu'on puisse conclure que les vieilles souches spontanément affaiblies au

laboratoire, comme celles de Behring et Uhlenhuth, Tb 1 et Tb 18, R_1 de Trudeau et, à plus forte raison, le BCG, ne peuvent plus récupérer leur virulence originelle. Je me bornerai à rappeler à ce propos les innombrables tentatives faites pour réactiver le BCG en employant *in vitro* et *in vivo* tous les procédés imaginables, et les expériences de passages poursuivies par R. E. Cummings et par A. S. Willis pendant dix ans, sans aucun résultat, avec le bacille R_1.

Stabilité des caractères de virulence du type.

Si les possibilités de récupération de la virulence se révèlent ainsi très restreintes, au moins lorsque les facteurs d'atténuation ont exercé leurs effets pendant un très grand nombre de générations, il est logique d'en inférer que la transformation d'un type bacillaire en l'autre, entraînant l'acquisition ou la perte de certaines propriétés pathogènes spécifiques, est encore plus problématique. Pourtant les unicistes, latents ou déclarés, n'ont pas perdu l'espoir d'obtenir l'interchangeabilité du type humain et du type bovin ou de muer le type bovin en type aviaire et inversement.

L'exposé, même résumé, des essais tentés dans cet ordre d'idées, m'entraînerait à des redites fastidieuses ; la plupart d'ailleurs ont, depuis longtemps, fait l'objet de critiques sévères et, semblait-il, définitives. Mais les récentes observations de K. A. Jensen et I. Klaer sur les infections mixtes obligent à reconsidérer le problème.

Sur 100 cas de tuberculose pulmonaire reconnus d'origine bovine au premier examen, et que ces auteurs ont pu suivre pendant un an, en pratiquant des isolements en série, deux se sont présentés finalement comme des infections mixtes ; chez 17 malades qui ont été surveillés pendant un à quatre ans, les derniers examens bactériologiques ont montré que des bacilles humains et des bacilles bovins coexistaient dans les expectorations Rejetant, un peu trop hâtivement à mon avis — car elle n'est nullement incompatible avec nos connaissances sur le développement et la valeur de l'immunité antituberculeuse —, l'hypothèse d'une surinfection, par un bacille humain, de sujets déjà contaminés par le bacille bovin,

K. A. Jensen et I. Klaer examinent deux éventualités : soit un changement dans les caractères du type bovin dysgonique, à la faveur d'une sorte de dissociation *in vivo* qui aboutirait à la production d'une variante se rapprochant du type humain par sa virulence et l'aspect rugueux de ses cultures, soit une véritable mutation du type bovin en type humain pendant son séjour dans les tissus de l'homme. Contre cette conception, que Jensen et Klaer tendent à reconnaître comme la plus vraisemblable, sans toutefois se prononcer d'une manière formelle, plaident les travaux de A. S. Griffith et d'autres dont on ne peut contester la solidité.

De même qu'ils sont exposés à subir chez leur hôte des modifications de leur virulence, exaspération ou atténuation, les bacilles tuberculeux se prêtent également à des variations morphologiques et physiologiques telles, que l'un des types emprunte à l'autre une partie de ses caractères et de ses propriétés spécifiques ; c'est ainsi que le bacille humain peut devenir provisoirement aussi dysgonique que le bacille bovin dans certains organismes, et qu'un bacille bovin, dysgonique et lisse à l'origine, peut se muer chez le porc en variante eugonique et rugueuse d'emblée. Mais de tels faits ne dépassent pas les limites de variations dans le cadre de l'espèce ou du type, et il ne semble pas qu'on puisse les invoquer en faveur de l'hypothèse mutationiste.

Quant aux expériences de N. Plum sur la transformation du bacille bovin en bacille aviaire, elles posent de nouveau le problème que Nocard avait déjà essayé de résoudre il y a plus de quarante ans.

Virulence et caractères bio-chimiques.

Rien dans l'aspect et la vigueur de leur végétation ne distingue les souches virulentes des souches atténuées. Les bacilles bovins peu pathogènes, isolés de lésions lupiques, peuvent être aussi dysgoniques que les bacilles bovins normaux et produire comme eux des colonies lisses. Mais les vieilles souches affaiblies comme Tb 18, R_1 et, surtout, BCG, se montrent beaucoup moins vivaces que les bacilles virulents et moins résistants aux agents de destruction : l'entretien de leurs cultures

exige des réensemencements plus réguliers et plus rapprochés ; mises en suspension dans l'eau physiologique, elles sont plus rapidement inactivées à la température ordinaire et à l'étuve ; lorsqu'on essaie de les cultiver à partir de fragments d'organes en employant la méthode de Löwenstein ou de Petroff, il faut éviter de faire agir trop longtemps les solutions d'acide sulfurique ou de soude.

Il est vraisemblable que les variations étendues et stables de la virulence s'accompagnent de modifications quantitatives et même qualitatives de la composition chimique des germes Cependant, si, grâce aux recherches de F. Sabin et T. A. Doan et de Roulet, on connaît exactement les réactions cellulaires pathologiques que déterminent respectivement les constituants lipoïdiques et protéidiques isolés des bacilles tuberculeux, rien ne nous autorise encore à considérer plus particulièrement l'un d'eux comme le vecteur, le facteur essentiel de la virulence.

Le BCG se distinguerait du bacille bovin normal, d'après A. Berthelot et M^lle^ Amoureux (1927), par la constitution et la proportion des holosides qu'il renferme. Pour Chargaff, la proportion des lipides totaux est plus élevée dans le bacille de Calmette et Guérin que dans la souche de Vallée, mais j'ai pu constater autrefois, avec L. Nègre, que ce germe atténué contient moins d'antigène lipoïdique fixateur de l'alexine que les bacilles bovins et humains normaux.

En vérité, ces renseignements n'ont qu'une valeur très approximative, car la comparaison ne porte pas, dans chaque cas, sur des éléments dérivés de la même souche, les uns ayant gardé les propriétés pathogènes originelles, les autres les ayant au contraire perdues, presque en totalité.

Les recherches de A. Borrel, Boez et de Coulon, ont établi que certaines souches bacillaires très virulentes peuvent être peu toxiques ou non toxiques pour le cobaye sain, en inoculation intracérébrale, alors que des souches atténuées font parfois preuve d'une très grande toxicité dans les mêmes conditions. Selon les mêmes auteurs, il n'y aurait pas davantage de relation entre la toxicité des tuberculines à l'égard du cobaye tuberculeux et la virulence des bacilles qui élaborent cette substance.

Virulence et allergie.

En liaison avec la dégradation de leurs propriétés pathogènes, sans toutefois qu'on puisse remarquer entre les deux phénomènes un parallélisme strict, les bacilles atténués se montrent inférieurs aux bacilles normaux quant à l'intensité de l'allergie qu'ils confèrent au cobaye. D'autre part, l'hypersensibilité tuberculinique dont ils sont responsables diminue graduellement après une période ascensionnelle et une période de stabilisation dont la durée est assez variable : chez l'homme, comme chez les animaux, la dose préparante de bacilles et la voie d'inoculation étant les mêmes, l'allergie s'évanouit totalement après un délai d'autant plus court que les germes inoculés sont plus affaiblis.

Enfin, toutes choses égales d'ailleurs, le stade préallergique est plus long de quelques jours ou de quelques semaines pour le BCG par exemple, que pour les bacilles normaux. Il ne semble pas que, chez le cobaye, quelle que soit la dose de BCG inoculée, la réactivité du derme se manifeste pendant plus d'une année : elle se montre ainsi plus durable que l'allergie due aux bacilles morts, mais moins que l'allergie produite par des germes restés un peu plus pathogènes, comme le bacille R_1 de Trudeau.

La précocité et l'intensité de l'allergie sont évidemment en relation avec la diffusion plus ou moins rapide et abondante des substances bacillaires préparantes dont il est d'ailleurs difficile, actuellement, de préciser la nature, mais elles dépendent aussi de la forme chimique et des qualités de ces substances, puisque l'augmentation de la dose de BCG inoculée ne compense pas l'infériorité de ses propriétés sensibilisantes. Quant à la durée de la réactivité tuberculinique, on peut soutenir, avec les mêmes chances de vérité ou d'erreur, qu'elle est liée soit à la disparition plus ou moins rapide des bacilles et à la cicatrisation des lésions, soit à la résorption ou à la destruction des substances préparantes qui proviennent de ces germes.

Sauf s'ils ont reçu des doses massives, les cobayes rendus allergiques par le BCG répondent aux intradermo-tuberculina-

tions par des réactions moins vives, moins régulièrement hémorragiques et nécrotiques, que celles des cobayes tuberculeux. Cette différence est beaucoup moins accusée chez les cobayes sensibilisés par le bacille R_1. Mais tous les animaux préparés par des inoculations de l'un ou l'autre de ces bacilles affaiblis résistent, comme les animaux sensibilisés par les bacilles morts, à l'injection de plusieurs doses de tuberculine mortelles pour les cobayes tuberculeux. Cette épreuve de toxicité constitue ainsi un excellent test pour apprécier la virulence des bacilles des mammifères à l'égard du cobaye.

Quelque probable qu'apparaisse le rôle de l'allergie dans certaines formes de la tuberculose, rien ne démontre qu'il est en relation avec la seule virulence des éléments infectants. Les lésions inflammatoires et exsudatives, qui modifient si fréquemment l'allure de la maladie, ont évidemment pour point de départ l'évolution d'un foyer métastatique. Mais, souvent, le développement des altérations péri-lésionnelles relève moins d'une multiplication excessive des germes que de réactions quasi-continues et durables, incessamment entretenues par la tuberculine libérée des corps microbiens. D'où ces manifestations aiguës ou subaiguës, quelque peu insolites : spléno-pneumonies, méningites, pleurésies, épanchements divers, etc., qui surviennent brusquement au cours des phases les plus paisibles de la tuberculose.

On pourrait enfin supposer que la virulence des bacilles intervient dans la réactivation des foyers assoupis si on ne savait, par l'observation et l'expérience, que maintes influences externes ou physiologiques souvent banales, sont capables, surtout à certaines périodes de la vie, de modifier la perméabilité des lésions, au point de favoriser un dangereux essaimage bacillaire.

Virulence et caractères cliniques de l'infection.

La découverte de R. Koch bouleversa à tel point la pathogénie de la tuberculose que, jusque dans ces dernières années, la plupart des phtisiologues considéraient que le développement de la maladie était essentiellement réglé par les moda-

lités de la contamination : nombre et virulence des bacilles, multiplicité des contacts infectants. Cependant les voix qui, dès le début du siècle, s'étaient élevées contre cette conception se firent de plus en plus nombreuses et pressantes pour restituer aux organismes réceptifs, c'est-à-dire au terrain, au milieu vivant exposé aux atteintes du bacille, une partie du rôle dont la rapidité des progrès de la bactériologie les avaient déchus. E. Sergent, J. Bordet, R. Jemma et V. Fici, furent des premiers à soutenir cette opinion, pendant que B. Lange, F. Bochetti et d'autres expérimentateurs s'ingéniaient à mettre en évidence l'influence primordiale des dispositions individuelles sur l'allure de l'infection bacillaire. Dans la suite, l'idée se répandit, au point de devenir banale, que la gravité, éminemment variable selon les individus, des tuberculoses naturelles, la diversité de leurs caractères cliniques et anatomo-pathologiques, étaient moins liées aux circonstances bactériologiques de la contagion qu'aux qualités particulières des humeurs et des tissus au sein desquels les bacilles avaient réussi à s'implanter.

Un premier point à retenir à l'actif du bacille, c'est que la maladie tuberculeuse n'est diffusée et entretenue dans l'espèce humaine et dans l'espèce bovine, les plus exposées, que par des germes doués d'une virulence plus ou moins marquée, mais assez forte pour que l'inoculation sous-cutanée de doses inférieures à 0 milligr. 001 produise chez le cobaye des lésions évolutives. Des bacilles aussi atténués que le BCG ou le R_1 sont incapables de se transmettre dans la nature car, même quand, à la faveur d'un artifice ou d'un accident, ils franchissent les barrières respiratoires ou digestives, ils sont rapidement investis par un tissu de granulation qui entrave leur essaimage ; puis leur destruction s'opère graduellement. On ne peut donc garder l'espoir que le bacille de Koch, comme l'avait pensé Et. Burnet, trouvera en lui-même son antidote, sous la forme de souches spontanément affaiblies, susceptibles de répandre chez les espèces réceptives, une infection bénigne mais vaccinante. Vous savez comment Arloing, von Behring, R. Koch et A. Calmette ont essayé de remédier à cette défaillance de la nature.

En ce qui concerne les souches normales des deux types de

bacilles des mammifères, il est difficile de décider si elles ont la même virulence pour l'homme, car les caractères cliniques de l'infection d'origine bovine, sauf une proportion plus importante de localisations ganglionnaires, ostéo-articulaires et méningées, ne diffèrent pas de ceux de l'infection d'origine humaine.

Quant aux bacilles humains qui, sauf de rares exceptions, sont responsables des formes viscérales les plus communes de la tuberculose, leurs propriétés pathogènes, telles qu'on peut les mettre en évidence dans les souches d'isolement, ne varient que dans une assez faible mesure ; et la plupart des auteurs conviennent que ces oscillations, révélées par l'inoculation au cobaye, n'ont aucune relation avec les modalités évolutives des processus tuberculeux.

Réserves faites pour les infections massives dans le jeune âge, c'est plus de leur propre substance que de la virulence des germes en cause que dépend l'avenir des tuberculeux. Au gré des dispositions héréditaires, des fluctuations et des troubles des sécrétions internes, hormonales ou autres, de changements dans le jeu profond des réactions physiologiques élémentaires, l'organisme refoule le bacille agresseur, l'emmure ou même le détruit, ou bien reste presque sans défense et se prête docilement à l'invasion. Entre ces deux extrêmes, toutes les nuances cliniques peuvent s'insérer, sans que l'on soit fondé à faire intervenir des variations de virulence pour en donner l'explication.

Des recherches déjà anciennes de L. Rabinowitsch, Möller, F. Bezançon et Philibert, sur l'action pathogène des bacilles paratuberculeux saprophytes, avaient permis d'entrevoir que le seul fait d'injecter avec du beurre ces germes par eux-mêmes inoffensifs, les rendait à tel point pathogènes, qu'ils devenaient capables de créer à distance, sur les poumons, des lésions nodulaires comparables aux lésions tuberculeuses vraies. Adoptant, en 1932, la technique d'enrobage des bacilles dans l'huile de paraffine employée par H. Vallée, d'abord pour ses essais de vaccination antituberculeuse des bovidés puis, avec H. Carré et P. Rinjard, pour la prémunition des bovidés contre l'entérite hypertrophiante, W. A. Hagan

et P. Lévine ont démontré que l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale au cobaye de bacilles acido-résistants saprophytes vivants, de bacilles de Johne, de bacilles aviaires et de bacilles bovins tués détermine le développement dans les poumons, de tubercules caséeux et de vastes foyers nécrotiques : la mort peut même survenir en moins de quatre semaines, surtout quand l'inoculation est faite dans le péritoine Les mêmes germes saprophytes vivants et les bacilles tuberculeux tués et mis en suspension dans de l'eau physiologique ne provoquent que de minimes lésions viscérales, même quand on en injecte des doses massives par voie veineuse.

Ces résultats furent confirmés et précisés par Noël Rist en 1938 et par Saenz pour ce qui concerne les bacilles humains et bovins tués, enrobés dans la paraffine solide selon la méthode de E. Coulaud, ou mis en suspension dans l'huile de paraffine. A. Saenz et G. Canetti ont même constaté que les bacilles bovins morts, enrobés, manifestent encore la supériorité de leur pouvoir pathogène sur celui des bacilles humains et des bacilles aviaires, quand on les inocule au lapin par voie testiculaire.

Il apparaît donc qu'un simple artifice de préparation et d'inoculation suffit pour promouvoir des bacilles acido-résistants saprophytes au rang de bacilles tuberculigènes, et pour conférer aux bacilles tuberculeux morts un pouvoir pathogène tel qu'ils déterminent, en quelques jours ou quelques semaines, des lésions pulmonaires comparables aux lésions produites par des bacilles vivants et virulents du même type. La vitalité des germes ayant été supprimée dans ces expériences, alors que leur pouvoir nocif spécifique persistait, il s'ensuit que la virulence, c'est-à-dire la végétabilité *in vivo*, considérée jusqu'ici comme un caractère essentiel, ne représente, en réalité, qu'un facteur secondaire du pouvoir pathogène des bacilles tuberculeux

De ce fait, si le problème de l'infection tuberculeuse perd un peu de son importance du point de vue microbiologique pur, il se trouve plus solidement posé sur le terrain physico-chimique, non seulement parce que l'intervention de produits bacillaires irritants et toxiques se manifeste avec plus d'évidence, mais aussi pour cette raison que les modifications

apportées par l'enrobage à la diffusion de ces produits ont pour effet d'aggraver leur nocivité à l'égard des tissus. Il n'est pas illogique de supposer que de semblables adjonctions aux éléments bacillaires peuvent se produire naturellement dans l'organisme même et que la virulence apparente des germes soit exposée à subir des variations étendues et redoutables sous l'influence de substances de nature diverse dont ils s'imprègnent dans les lésions tuberculeuses.

Virulence et immunité.

Au début de ce rapport, j'ai insisté sur ce point que le sort des tuberculeux se règle moins sur la virulence du germe en cause que sur les propriétés foncières de leur organisme, c'est-à-dire sur ces aptitudes innées, encore si obscures, que nous intégrons dans la notion du terrain et qui s'expriment par des réceptivités individuelles infiniment nuancées. Mais l'évolution clinique de la tuberculose dépend aussi des modifications immunitaires qui se développent quelques semaines après la contamination et ne cessent d'augmenter dans la suite

Tôt ou tard, en effet, après qu'ils ont pénétré par les voies respiratoires, les bacilles passent dans la circulation sanguine : la gravité de la primo-infection dépend même de la précocité, de l'abondance et de la durée de cette bacillémie initiale. Inévitablement, si l'organisme restait inerte devant une telle menace les innombrables foyers ainsi créés durant cette phase ne tarderaient pas à entrer en activité et à devenir à leur tour la source d'émissions bacillaires nouvelles, et la tuberculose prendrait l'allure rapidement envahissante que nous observons d'ordinaire chez le cobaye et chez le lapin.

Heureusement pour l'homme et pour les grands animaux, les poussées bacillémiques, précoces ou tardives, à moins qu'elles ne soient massives, aboutissent rarement à la généralisation granulique, voire à l'éclosion de foyers métastatiques éloignés. En outre, même s'il est impuissant à détruire les bacilles qui ont réussi à s'implanter en divers points, surtout dans les poumons et les ganglions lymphatiques tributaires, l'organisme parvient souvent à les cantonner d'une manière définitive derrière la barrière fibreuse qu'il a édifiée.

C'est en raison de ces entraves apportées à leur libre développement par la résistance naturelle et par l'immunité acquise que, chez l'homme et chez les bovidés infectés, les bacilles finissent alors par ne plus manifester leurs propriétés pathogènes caractéristiques. Mais, sauf dans les circonstances que j'ai rappelées tout à l'heure, par exemple lorsqu'il s'agit de lupus, ces propriétés pathogènes restent intactes, et il est facile de constater par l'inoculation au cobaye, qu'elles demeurent telles dans les lésions occultes aussi bien que dans les lésions actives, et cela jusqu'au terme de la maladie.

Tous les procédés imaginables ont été mis en œuvre pour produire artificiellement, chez l'homme et chez les animaux, cet état réfractaire que détermine l'infection tuberculeuse.

La méthode idéale qui permettrait d'atteindre ce but consisterait dans l'injection préventive de germes tués ou de substances extraites de leur protoplasme. De nombreux essais ont été tentés dans ce sens, mais il n'apparaît pas qu'aucun d'eux ait abouti à un résultat démonstratif. C'est pourquoi on s'en tient actuellement à une sorte de compromis entre la jennérisation et la vaccination pastorienne, qui comporte l'usage de bacilles vivants, mais avirulents ou très peu virulents et incapables, dans les conditions prévisibles, de récupérer leur pouvoir pathogène.

Les expériences faites au cours de ces quarante dernières années par von Behring, R. Koch, Mac Fadyean et leurs collaborateurs, par A. Calmette et C. Guérin, démontrent qu'un véritable état de résistance contre la tuberculose peut être conféré aux grands animaux, soit par l'inoculation de bacilles naturellement atténués pour l'espèce, comme les bacilles humains et les bacilles aviaires pour les bovidés, soit par l'inoculation de bacilles humains ou bovins spontanément ou artificiellement atténués.

Chez le bœuf, au moins jusqu'à une certaine limite, l'affaiblissement des propriétés immunisantes des bacilles, qui accompagne inévitablement la perte de la virulence, peut être compensé par une augmentation convenable de la dose de bacilles-vaccins administrée, ou par la répétition des injections vaccinantes. Mais le cobaye et le lapin se comportent

tout autrement car, s'il résulte des expériences de P. Römer, A. Krause, B. Lange et d'autres, que l'inoculation de bacilles atténués au cobaye est susceptible de diminuer sa réceptivité aux épreuves virulentes, la valeur de la résistance ainsi obtenue est en raison inverse de la gravité de l'infection vaccinante, donc des propriétés pathogènes résiduelles des bacilles-vaccins.

*
* *

Puisque cette immunité antituberculeuse se développe à la faveur des réactions cellulaires et, sans doute aussi, humorales mises en jeu par des substances issues des corps bacillaires, qu'elle est d'autant plus solide que ces substances sont libérées en plus grande abondance et sous une forme plus adéquate, par des germes ayant gardé la structure et la composition chimique la plus compatible avec le libre exercice de leur virulence spécifique, nous devons en tirer cette conclusion optimiste que l'on réussira, quelque jour, à en isoler tous les facteurs au moyen de simples opérations physico-chimiques, à partir des bacilles eux-mêmes ou des produits qu'ils diffusent dans les milieux de culture. Ainsi s'achèvera, pour le bien de tous les hommes, l'œuvre expérimentale à laquelle se sont attachés, de toute la force de leur intelligence et de leur cœur, tant de nobles et généreux esprits du monde entier, depuis les magnifiques découvertes de Villemin et de R. Koch.

COMPORTEMENT DES LAPINS INOCULÉS A PLUSIEURS REPRISES AVEC DES BACILLES TUBERCULEUX AVIAIRES MORTS ÉPROUVÉS PAR DES BACILLES AVIAIRES VIVANTS

par F. VAN DEINSE.

(*Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose.*)

On sait que les animaux de laboratoire, auxquels on injecte des bacilles tuberculeux, tués par chauffage, et émulsionnés dans de l'eau physiologique, deviennent allergiques. Les travaux de A. Borrel, Sala, Wolff-Eisner, Kromprecher et de A. Boquet et L. Nègre ont bien mis en évidence ce pouvoir allergisant des corps bacillaires morts. Cette hypersensibilité aux protéides bacillaires, créée par l'introduction de bacilles tuberculeux morts dans l'organisme animal, ne s'accompagne toutefois d'aucune immunité appréciable. C'est l'opinion à laquelle A. Calmette, A. Boquet et L. Nègre sont arrivés après des expériences, qui semblent concluantes, et de nombreux auteurs pensent comme eux, parmi lesquels nous ne citons que Uhlenhuth en Allemagne et Theobald Smith aux Etats-Unis. Il est vrai que d'autres auteurs estiment que des animaux, préparés par des injections de bacilles tuberculeux morts, offrent une certaine résistance à une inoculation d'épreuve virulente, se traduisant par une survie plus longue ; ainsi par exemple E. L. Opie et J. Freund ; A. Branch et J. F. Enders en Amérique, Loeffler et Matsda en Allemagne (qui ont immunisé des chiens par des injections de bacilles tuberculeux bovins, tués à la chaleur sèche), Nathan Raw en Angleterre. Maragliano, en Italie, recommande depuis 1903 son procédé de vaccination des enfants nouveau-nés, basé sur l'emploi de bacilles stérilisés par chauffage, procédé appliqué

sur une assez grande échelle en Italie. Bornons-nous à ces quelques noms, qui n'ont pas la prétention d'épuiser toute la liste des auteurs qui se sont occupés de cette question. Ce qui frappe, c'est que la plupart des chercheurs qui se sont intéressés au problème de l'immunisation par des bacilles tuberculeux morts se sont adressés pour leurs essais à des bacilles des mammifères.

Elise L. L'Espérance (1) et E. M. Medlar (2) ont allergisé ou immunisé des animaux vis-à-vis de bacilles de type aviaire, par des injections de bacilles humains ou bovins. La première a vu que des cobayes, injectés avec des bacilles des mammifères, tués par chauffage, devenaient plus sensibles à une inoculation de bacilles aviaires vivants, et répondaient à cette inoculation par des lésions plus importantes que les témoins non préparés. Medlar, sur 4 lapins préparés par une injection sous-cutanée de 5 milligrammes de bacilles humains vivants, et éprouvés six mois plus tard par une inoculation intraveineuse de 1 milligramme de bacilles aviaires vivants, eut trois survies longues (de cent vingt-deux à cent quarante-neuf jours), tandis qu'un lapin mourut en sept jours d'une réaction hyperergique.

A l'Institut Pasteur, C. Ajo et R. K. Goyal ont réussi à allergiser des lapins par des injections de bacilles aviaires morts (3).

Nos premières expériences, concernant la préparation de lapins par des injections répétées de bacilles aviaires morts, datent de 1934. Depuis, nous avons continué nos recherches sur ce sujet, et nous avons surtout essayé de nous rendre compte des réactions que présentent les lapins ainsi préparés, à la suite d'une inoculation d'épreuve avec des bacilles aviaires vivants, en variant les conditions expérimentales. Au début de ces recherches, nous avons fait quelques vaccinations croisées, nous servant d'une souche de bacilles aviaires pour la vaccination aux bacilles morts et d'une autre pour les épreuves. Comme ces essais semblaient donner des résultats

(1) *J. of Immunol.*, **16**, 1929, p. 27.
(2) *Amer. J. Pathol.*, **7**, 1931, p. 475.
(3) *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 877.

moins réguliers, et que nous voulions surtout étudier le mécanisme des réactions de l'organisme vacciné par des bacilles aviaires morts, plutôt que les effets d'une souche vis-à-vis d'une autre, nous nous sommes borné, par la suite, aux seules expériences avec des bacilles homologues.

Certains résultats de ces expériences ont été consignés brièvement dans différentes notes à la Société de Biologie (4). Nous voudrions faire aujourd'hui une synthèse des enseignements que nous avons cru pouvoir tirer de cette expérimentation.

Les injections répétées au lapin de bacilles aviaires, tués par chauffage à 70° pendant une heure, et émulsionnés dans de l'eau physiologique à la dose de 1 milligramme de corps bacillaires par centimètre cube, allergisent fortement cet animal. Aussi, quand on fait toutes les injections par voie veineuse, tous les cinq jours, risque-t-on fort de voir mourir les lapins par shock dans les vingt-quatre heures qui suivent par exemple la huitième injection. Il vaut donc mieux ne pas pousser trop loin ces injections intraveineuses de bacilles aviaires morts. Pour les phénomènes que nous voulons étudier, il suffit de donner trois injections intraveineuses de 1 milligramme de corps bacillaires morts chacune ; on peut ensuite faire encore quelques injections sous-cutanées, mais cela n'est pas indispensable. Ces injections de bacilles aviaires morts, même quand on évite les phénomènes de shock aigu en limitant leur nombre, provoquent quand même des lésions toxiques, notamment dans les reins : ce sont des glomérulo-néphrites localisées, des dégénérescences de quelques tubes contournés, et surtout des réactions interstitielles, qui aboutissent tardivement à de la sclérose rénale, comparable à ce que l'on observe chez l'homme comme séquelles d'anciennes néphrites aiguës. Nous renvoyons au mémoire, publié récemment ici même, et consacré à la toxicité si spéciale des bacilles tuberculeux aviaires. Nous donnons l'observation suivante comme exemple :

(4) *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 1063 ; **121**, 1936, p. 18 ; **121**, 1936, p. 117 (en coll. avec E. Loukidis) ; **121**, 1936, p. 723 ; **124**, 1937, p. 893 ; **129**, 1938, p. 649.

Lapin D-79 : reçoit quatre injections intraveineuses et trois injections sous-cutanées de 1 milligramme de bacilles aviaires Tr. III morts chacune, tous les cinq jours. Première injection le 22 janvier 1936. Il est inoculé le 28 février 1936 avec 0 milligr. 01 du même bacille aviaire vivant, dans la rate, après laparotomie sous narcose. Il a eu, à la suite de cette intervention, un peu de polynucléose pour toute réaction, et il n'en est résulté aucune conséquence fâcheuse. L'animal meurt le 19 octobre de la même année, donc neuf mois après la première injection vaccinale, dans un état de maigreur assez marqué. A l'autopsie, on trouve une petite rate, portant une cicatrice ; les poumons sont un peu hyperémiés, le foie semble normal, de taille plutôt petite, mais *les reins sont décolorés et ont une surface bosselée*. On ne trouve aucune lésion spécifique. Les ensemencements des organes sont restés stériles. A l'examen histologique, ce qui frappe, c'est l'état du rein, dont les coupes montrent des lésions vasculaires, de la *sclérose interstitielle*, de la contraction des tubes contournés, et une *sclérose des glomérules*. Aucune lésion spécifique. Ces lésions, dues sans aucun doute à l'intoxication ancienne par les injections répétées de bacilles aviaires morts, sont suffisantes pour expliquer la mort de l'animal chez lequel l'inoculation intrasplénique d'une petite dose de bacilles aviaires vivants n'a laissé pour toute trace qu'une cicatrice.

On voit d'ailleurs que ces injections de bacilles aviaires morts ne sont pas indifférentes à l'organisme animal en constatant que les lapins perdent régulièrement du poids pendant ce traitement (environ 300 grammes en moyenne). Ils récupèrent cette perte de poids en général dès la cessation des injections. La formule leucocytaire est un autre témoin de l'influence des bacilles aviaires morts, par la lymphocytose assez marquée qu'elle révèle, rarement accompagnée d'une monocytose modérée. On trouve même chez certains lapins ainsi préparés des signes de dégénérescence des globules rouges, par exemple :

Lapin G-278 : cet animal a reçu trois injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts Tr. XII chacune. Première injection le 20 janvier 1938. Le 10 février, date de l'épreuve, il a la formule leucocytaire suivante :

Polynucléaires neutrophiles	29 p. 100
Polynucléaires basophiles	3 —
Lymphocytes.	51 —
Monocytes	16
Plasmazellen	1 —

Les globules rouges montrent de l'anisocytose et de la polychromatophilie.

Ces modifications dans la série rouge se sont accentuées à la suite de l'inoculation d'épreuve de 1 milligramme de bacilles aviaires Tr. XII vivants par voie veineuse : il y avait de la poïkilocytose et le sang circulant contenait des normoblastes.

Quand on pratique, chez les lapins ainsi préparés, une injection intraveineuse de 0,1 à 1 milligramme de bacilles tuberculeux aviaires vivants, appartenant à la même souche qui a fourni les bacilles morts, on assiste à des réactions très différentes, d'après la durée du temps qu'on aura laissé s'écouler depuis la première injection vaccinale.

On verra, d'abord, que certains animaux font une toxi-infection de type Yersin et meurent dans des délais sensiblement pareils à ceux qu'on observe chez les témoins, inoculés avec la même dose par la même voie. Ce sont des lapins chez lesquels l'inoculation d'épreuve a été pratiquée trop tôt, avant même qu'un état d'allergie ait eu le temps de s'installer avec suffisamment d'intensité. En voici deux exemples :

Lapin B-278 : a reçu trois fois 1 milligramme de bacilles aviaires Tr. XII morts par voie veineuse, à cinq jours d'intervalle ; première injection le 20 janvier 1938. Inoculation d'épreuve le 10 février : 1 milligramme de la même culture vivante dans la veine. L'animal meurt le 22 du même mois, douze jours après l'épreuve, d'une tuberculose Yersin typique, et ses organes contiennent de nombreux bacilles.

Lapin C-20 : a reçu deux injections intraveineuses de bacilles aviaires morts (1 milligramme chacune, cult. Tr. XII). Première injection le 20 janvier 1938. L'inoculation d'épreuve a lieu le 31 janvier (0,1 milligramme, même culture vivante) Le lapin meurt le 21 février, vingt et un jours après l'épreuve, d'une tuberculose Yersin classique, ayant de nombreux bacilles dans ses organes.

Une deuxième catégorie de lapins, préparés par des injections de bacilles aviaires morts et éprouvés par voie veineuse avec des bacilles aviaires vivants, meurent après une survie beaucoup plus courte que les témoins : ce sont ceux qui reçoivent l'inoculation d'épreuve à un moment où ils sont extrêmement allergiques. Exemples :

Lapin G-N-281 : a été inoculé trois fois à cinq jours d'intervalle par voie veineuse avec 1 milligramme de bacilles aviaires morts (cult. Tr. XII). Inoculation d'épreuve seize jours après la première injection vaccinale (1 milligramme même culture, voie I. V.). L'animal meurt neuf jours après l'épreuve d'une toxi-infection Yersin ; ses organes ne contiennent que de rares bacilles.

Lapin C-30 : reçoit deux injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (Tr. XII), à cinq jours d'intervalle ; il est éprouvé onze jours après la première injection (1 milligramme même culture vivante, voie I. V.). Il meurt sept jours après l'épreuve, également d'une toxi-infection Yersin.

Il y en a même qui meurent de shock dans les douze heures qui suivent l'injection d'épreuve ; exemple :

Lapin B 209 : reçoit trois injections intraveineuses et deux sous-cutanées de 1 milligramme chacune de bacilles aviaires morts (cult. Tr. XII). Il meurt douze heures après l'inoculation d'épreuve (0,1 milligramme même culture vivante, voie I. V.), survenue pourtant presque deux mois après la première injection de bacilles morts. Il a les organes congestionnés, comme on le voit dans la mort par shock à la suite d'une injection massive de tuberculine chez l'animal allergique.

Mais ce dernier cas est plutôt exceptionnel dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées.

En ce qui concerne les cas de survie courte, dont nous venons de donner deux exemples, ce sont eux que nous avons cru pouvoir désigner sous le nom de « toxi-infections Yersin en raccourci » (5) On sait en effet que les lapins neufs, inoculés par voie veineuse avec 1 milligramme d'une culture de tuberculose aviaire pathogène, ne meurent jamais avant le douzième jour d'une toxi-infection Yersin, l'allergisation, à laquelle est due la mort dans cette affection, tout au moins dans les cas à évolution rapide, n'ayant pas encore atteint l'intensité suffisante avant ce délai. Les lapins préparés par des injections de bacilles aviaires morts, par contre, n'ont pas besoin de ce délai, étant déjà allergiques, et on peut donc voir mourir ces animaux de leur toxi-infection dans des délais beaucoup plus courts que les témoins, à la suite de l'inoculation d'épreuve.

Dans une troisième catégorie de lapins, vaccinés et éprouvés, on assiste à des survies assez importantes. Ce sont des animaux qui ne meurent pas de tuberculose Yersin, caractérisée comme on sait par l'absence presque régulière de toute lésion nodulaire, visible à l'œil nu, et par la rareté des nodules microscopiques. Les lapins en question meurent, au contraire, en présentant à l'autopsie des images de granulie plus ou moins géné-

(5) *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p 202.

ralisée, quelquefois localisée plus particulièrement sur un organe essentiel comme par exemple le rein. Exemples :

Lapin N-239 : a reçu trois injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle de 1 milligramme de bacilles aviaires morts (cult. Tr. XII), et une inoculation d'épreuve de 1 milligramme de la même culture vivante, soixante-huit jours après la première injection vaccinale. Il meurt cinquante-six jours après l'épreuve et présente à l'autopsie des granulations caséeuses confluentes aux lobes pulmonaires supérieurs droit et gauche, et un semis de petites granulations caséeuses sur les reins. Foie et rate : rien à noter.

Lapin N-220 : est injecté trois fois par voie veineuse à cinq jours d'intervalle avec 1 milligramme de bacilles aviaires morts (cult. Tr. XII), et est éprouvé, cinquante-six jours après la première injection de bacilles morts, par l'inoculation intraveineuse de 0,1 milligramme de la même culture vivante. Il est mort quarante-six jours après cette épreuve, et on trouve à l'autopsie d'assez nombreuses granulations caséeuses sur les poumons, et les reins, fortement tuméfiés, sont absolument criblés de granulations, la plupart caséeuses. Il y a également un semis de petites granulations sur le péritoine pariétal et viscéral (diaphragme), et l'appendice est, lui aussi, farci de granulations caséeuses. Il se trouve une granulation caséeuse sur la surrénale gauche. L'état des reins suffit amplement pour expliquer la mort de cet animal.

Enfin, dans une quatrième catégorie, nous pouvons ranger des lapins succombant dans un état de cachexie plus ou moins profonde, après des survies importantes, et ne présentant à l'autopsie que des arthrites tuberculeuses, localisées sur quelques articulations des extrémités, sans autres lésions macroscopiques, ou ayant tout au plus quelques rares nodules, pulmonaires par exemple, en voie de régression. Nous donnons les exemples suivants :

Lapin G-C-225 : a eu trois injections intraveineuses et deux sous-cutanées, à cinq jours d'intervalle, de 1 milligramme de bacilles aviaires morts chacune (cult. Tr. XII). Il reçoit une injection d'épreuve de 1 milligramme de la même culture vivante, par voie veineuse, sept mois après la première injection vaccinale. L'animal meurt cent quatre-vingt-cinq jours après l'épreuve, d'une congestion pulmonaire, son poids étant tombé de 2.260 à 1.900 grammes. La rate est atrophiée. On ne trouve aucune lésion tuberculeuse, sauf une seule arthrite tuberculeuse, localisée à une articulation métatarso-tarsienne gauche.

Lapin B-G 662 : a été préparé comme le précédent et a été éprouvé, lui aussi, par une injection intraveineuse de 0 milligr. 1 de la même souche vivante, sept mois après la première injection de bacilles morts. Il est mort cent cinquante et un jours après l'épreuve, son poids étant tombé de 1.970 à 1.400 grammes. On trouva à l'autopsie le foie et la rate réduits à la moitié de leur volume normal, et une tuberculose des articulations

huméro-ulnaire et tibio-métatarsale gauches, sans aucune autre lésion spécifique nulle part.

Lapin G-662 : préparé, lui aussi, comme le précédent et éprouvé sept mois après le début de la vaccination par une injection intraveineuse de 0 milligr. 1 de la même culture vivante. Il meurt sept mois après l'épreuve, cachectique, ayant le foie et la rate atrophiés, mais nulle part aucune lésion nodulaire. Il est porteur d'une tuberculose importante du talon gauche et d'une arthrite tuberculeuse moins importante huméro-ulnaire gauche.

Nous avons, bien entendu, inoculé régulièrement des lapins témoins non préparés, en même temps que les animaux vaccinés, et ces témoins sont tous morts d'une toxi-infection Yersin typique, dans les délais normaux (douze à trente jours). Nous ne reproduisons pas les protocoles concernant ces inoculations témoins pour ne pas allonger démesurément ce mémoire.

Les lapins appartenant aux deux dernières catégories ont été éprouvés à un moment généralement plus éloigné du début de la vaccination que ceux des deux premières catégories. En dehors du temps qui s'écoule entre la première injection vaccinale et l'épreuve, il y a d'autres facteurs qui déterminent le type de réaction que présentera le lapin à la suite de l'inoculation d'épreuve : ce sont des facteurs individuels. Mais, en général, on peut dire que plus on s'éloigne de la vaccination, plus les survies deviennent longues. Nous avons remarqué notamment qu'à partir du soixantième jour après la première injection vaccinale l'inoculation d'épreuve ne produit plus, chez les lapins préparés, de toxi-infection type Yersin. On n'aura plus, à partir de cette date, que des lapins qui mourront de granulie plus ou moins intense, à survie dépassant facilement deux mois, et quand on pratique l'inoculation d'épreuve par exemple six ou sept mois après les injections de bacilles aviaires morts (émulsionnés dans de l'eau physiologique), les animaux survivront cinq à sept mois à l'épreuve et finiront par mourir cachectiques, ne présentant plus à l'autopsie que des arthrites tuberculeuses, localisées à quelques rares articulations des extrémités, et quelquefois de rares nodules en voie de régression, lésions en somme insignifiantes.

A première vue, on semble assister à une véritable immunité qui, comme cela a été maintes fois vérifié pour d'autres espèces

bacillaires, s'installerait bien après l'allergie (6). Pourtant, il est admis par beaucoup d'auteurs que les bacilles morts ne sont pas capables de créer une immunité tant soit peu importante, comme nous l'avons montré dans l'introduction à ce mémoire. On voit, d'ailleurs, chez nos lapins vaccinés par des injections répétées de bacilles aviaires morts, de véritables lésions tuberculeuses s'installer, qui prouvent que ces animaux, malgré la vaccination, ne sont guère à l'abri de la virulence du bacille aviaire vivant.

Il nous a donc semblé qu'on pouvait expliquer autrement la longue survie des lapins appartenant aux dernières catégories. En effet, ce qui nous frappe surtout, c'est que les lapins éprouvés après un délai dépassant soixante jours en partant de la première injection vaccinale ne font plus de toxi-infection Yersin. Ils semblent prémunis contre cette intoxication aiguë d'un organisme hyperergique, qui caractérise la tuberculose Yersin. Il est difficile de ne pas voir là un effet de *désensibilisation :* l'organisme du lapin est d'abord fortement allergisé par l'introduction massive de corps bacillaires aviaires morts, puis *désensibilisé* au fur et à mesure de la libération des protéides bacillaires provenant de foyers disséminés de bacilles aviaires morts. J. Freund et E.-L. Opie (7) ont émis récemment une opinion analogue en admettant qu'une désensibilisation de l'organisme tuberculeux pouvait être causée par un excès d'antigène formé durant l'infection tuberculeuse.

Si, à côté de cette désensibilisation, il existe une véritable immunité chez nos lapins, celle-ci n'est pas bien efficace, vu que le bacille aviaire trouve l'occasion de déployer sa faible virulence, en créant, chez ces animaux vaccinés, soit des nodules, soit des lésions articulaires caractéristiques, exactement comme on les trouve chez des lapins neufs, inoculés avec des doses trop faibles de bacilles aviaires pour occasionner l'allergisation rapide et l'intoxication aiguë nécessaire pour déclencher une tuberculose Yersin. Il est vrai qu'on trouve généralement dans les organes des lapins vaccinés et éprouvés, même quand ils sont morts d'une tuberculose Yersin, beaucoup

(6) A. Boquet et L. Nègre. Ces *Annales*, **40**, 1926, p 11.
(7) *J. of Exp. Med.*, **68**, n° 2, 1938, p. 273.

moins de bacilles que dans ceux des lapins neufs, morts eux aussi d'une tuberculose Yersin, ce qui semble bien indiquer une certaine ébauche d'immunité chez les animaux vaccinés aux bacilles aviaires morts.

Dans les cas de mort par cachexie, après une survie de plusieurs mois, chez les lapins vaccinés et éprouvés tardivement, présentant des arthrites tuberculeuses, plusieurs explications se présentent à l'esprit. On peut d'abord attribuer la cachexie et la mort qu'elle entraîne à une disparition de la désensibilisation et à un empoisonnement progressif de l'organisme par les protéides bacillaires, libérées dans les foyers péri-articulaires dans lesquels les bacilles provenant de l'inoculation d'épreuve se sont surtout cantonnés (comme des ensemencements comparatifs du pus articulaire d'une part, et des organes d'autre part, prélevés chez les lapins vaccinés et éprouvés, présentant ces lésions, nous l'ont appris). On peut également attribuer ces morts par cachexie aux lésions organiques, rénales par exemple, véritables scléroses interstitielles souvent, auxquelles nous avons déjà fait allusion plus haut, reliquats des réactions interstitielles et des glomérulonéphrites, dues aux injections de bacilles aviaires morts et qui, à elles seules, seraient suffisantes à causer la mort dans certains cas par azotémie. Enfin, il est possible et même probable que ces différentes causes s'entremêlent pour amener à la mort ces animaux qui s'étaient si bien défendus contre l'inoculation d'épreuve, rapidement mortelle pour les témoins.

Les lapins traités par des injections de bacilles aviaires morts et éprouvés par une injection de bacilles aviaires vivants ont été suivis cliniquement par des pesées, des prises de température et des examens réguliers de la formule leucocytaire. Nous allons maintenant résumer brièvement les renseignements que nous devons à ces examens.

Nous avons déjà indiqué plus haut que les injections de bacilles aviaires morts chez les lapins sont généralement accompagnées d'une baisse souvent passagère du poids. L'amaigrissement va de pair avec une baisse de la température dont la courbe suit un tracé à peu près parallèle à celui du poids. L'inoculation d'épreuve est suivie d'une baisse de poids,

continuant jusqu'à la mort, dans les cas où celle-ci survient rapidement, donc par exemple chez les animaux qui meurent de tuberculose Yersin « en raccourci ». On assiste parfois à une montée du poids les premiers jours, suivie de la descente fatale, même dans des cas de courte survie (treize jours par exemple). Ou bien le poids reste en plateau, pour ne descendre qu'après un délai plus ou moins long. Il y a même des cas où l'on voit le poids tantôt descendre, tantôt monter, puis redescendre et remonter ensuite, mais la mort est toujours précédée d'une sérieuse baisse du poids. Plus la survie est longue, plus la courbe du poids montre des hauts et des bas, traduisant probablement les différentes phases de la lutte qui se joue dans l'organisme contre l'infection et l'intoxication. Exemple :

Lapin G-N-255 : a reçu trois injections intraveineuses de 1 milligramme de bacilles aviaires morts chacune (cult. Tr. XII). Au moment de l'inoculation d'épreuve (0 milligr. 1 voie veineuse, même cult. vivante), il pèse 2.440 grammes (le 3 mars 1938, quarante-deux jours après la première dose vaccinale). Le 15 mars, douze jours après l'épreuve, il pèse 2 540 grammes. Puis, le poids montre les variations suivantes : le 22 mars, 2.270 grammes ; le 31 mars, 2.380 grammes ; le 10 mai, 1.840 grammes ; le 19 mai, 1.980 grammes ; puis c'est la baisse terminale : le 17 juin, 1.550 grammes. L'animal meurt le 28 juin, cent dix-sept jours après l'épreuve, dans un état de cachexie. Rate et foie sont atrophiés Il y a plusieurs granulations caséeuses sur les reins et les surrénales, et une tuberculose des articulations du métatarse et du métacarpe droite et gauche. Le pus de ces articulations contient de nombreux bacilles. Par contre, les ensemencements de la rate restent stériles.

En ce qui concerne la formule leucocytaire, voici en résumé ce que nous avons trouvé. La lymphocytose relative, qui résulte de la vaccination, fait place, dans les quatre à cinq heures qui suivent l'introduction par voie veineuse des bacilles vivants de l'épreuve, à une neutrophilie plus ou moins accusée, qui cède la place, dès le lendemain, à de la lymphocytose relative devenant de plus en plus prononcée dans les jours suivants. Nous avons cru remarquer que chez les animaux hyperergiques qui vont mourir d'une tuberculose Yersin à la suite de l'épreuve, ce jeu de bascule entre les granulocytes et les lymphocytes est beaucoup moins prononcé. On sait, d'autre part, qu'une monocytose très forte constitue l'un des signes carac-

téristiques de la toxi-infection Yersin. Pour V. Schilling (8), la monocytose est un signe d'allergisation en général. Or, si certains de nos lapins vaccinés et éprouvés ont eu exceptionnellement une monocytose marquée, allant jusqu'à 33 p. 100 dans un seul cas, le pourcentage des monocytes est resté normal pour la moitié de ces animaux et, pour le reste, la monocytose fut modérée (10 à 18 p. 100) et passagère. (Aucune règle ne semblait présider au moment de l'apparition de cette monocytose passagère.) Si l'opinion de Schilling est exacte, ceci pourrait peut-être plaider en faveur de notre manière de voir, attribuant à une désensibilisation la résistance à la toxi-infection Yersin, que manifestent les lapins vaccinés aux bacilles aviaires morts et éprouvés tardivement par une inoculation veineuse de bacilles aviaires vivants, rapidement mortelle pour les témoins.

On trouve également de la basophilie chez un certain nombre des lapins à monocytes, signe d'intoxication, semble-t-il (9).

En général, il doit y avoir plusieurs facteurs qui interviennent dans le déterminisme de la formule leucocytaire chez ces animaux, tout comme pour les autres phénomènes cliniques qu'on peut observer chez eux et qui rendent l'interprétation des formules infiniment plus difficile que chez l'animal neuf, inoculé avec des bacilles aviaires à dose suffisante pour déclencher une tuberculose Yersin rapidement mortelle.

Dans un certain nombre de cas on trouve des modifications des globules rouges chez les animaux préparés et éprouvés : l'apparition de normoblastes dans le sang circulant, de l'anisocytose, de la polychromatophilie et même de la poïkilocytose. La plupart des animaux qui présentent de telles modifications de la série rouge font en même temps de la monocytose modérée. On doit les attribuer sans doute à une intoxication des organes hématopoïétiques, tout comme l'augmentation des granulocytes basophiles.

Nous rappelons pour mémoire que E. Loukidis et T. Kielanowski ont fait dans notre laboratoire des recherches concernant la bacillémie chez des lapins vaccinés par des bacilles

(8) *Med. Welt*, n° 3, 15 janvier 1938, p. 82.
(9) Van Deinse et Solomidès. *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 828.

aviaires morts et des lapins neufs, inoculés par voie veineuse avec 1 milligramme de bacilles aviaires vivants (10). Voici ce que ces auteurs ont trouvé : chez le lapin non vacciné, inoculé par voie veineuse avec 1 milligramme de bacilles aviaires pathogènes, le sang circulant contient des bacilles pendant toute la durée de l'évolution de la tuberculose Yersin. Cette bacillémie est très discrète et peut ne pas dépasser la valeur de 2 à 20 corps bacillaires par centimètre cube de sang. Elle semble toutefois être favorisée par une infection intestinale intercurrente. Par contre, chez les lapins vaccinés, les bacilles disparaissent rapidement du sang circulant. Cette disparition est durable. Toutefois, on voit réapparaître passagèrement les bacilles dans le sang circulant chez le lapin vacciné et éprouvé à la suite d'un traumatisme grave (splénectomie), ce qui montre la persistance des bacilles vivants d'épreuve dans l'organisme vacciné et leur recrudescence de vitalité sous l'influence d'un traumatisme. R. Debré et J. Paraf ont constaté en 1921 la disparition rapide du sang circulant des bacilles injectés à des cobayes tuberculeux par voie cardiaque (11). J.-P. Duchaine a fait des constatations analogues chez le lapin, rendu allergique par une injection de BCG (12).

Résumé et Conclusions.

Quand on prépare des lapins par des injections de bacilles aviaires, tués par chauffage (une heure à 70°), émulsionnés dans de l'eau physiologique (13) à raison de 1 milligramme de corps bacillaires par centimètre cube, en pratiquant chez ces animaux par exemple trois injections intraveineuses de 1 milligramme chacune, suivies ou non de deux ou trois injections sous-cutanées à cinq jours d'intervalle, on constate qu'ils sont fortement sensibilisés vis-à-vis d'une infection d'épreuve de 0.1 à 1 milligramme de bacilles aviaires vivants, introduits par

(10) *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 271.
(11) *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 1921, p. 15.
(12) *Amer. Rev. Tuberc.*, **37**, 1938, p. 507 et 520.
(13) Quand on émulsionne les bacilles morts dans de la paraffine au lieu d'eau physiologique, les résultats sont très différents ; voir la note déjà citée : *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 202.

voie veineuse. On s'en aperçoit quand on fait l'inoculation d'épreuve à un moment pas trop éloigné de la première injection de bacilles morts, par exemple trois ou quatre semaines. Certains animaux, préparés et éprouvés dans ces conditions, mourront alors d'une toxi-infection Yersin, dans les mêmes délais que les témoins non préparés, d'autres beaucoup plus rapidement d'une réaction hyperergique (toxi-infection Yersin « en raccourci »).

Plus on laisse s'écouler de temps entre la première injection vaccinale et l'inoculation d'épreuve, plus nombreux seront les lapins qui ne mourront plus de toxi-infection Yersin, mais de granulie plus ou moins généralisée. Quand le délai entre la première inoculation de bacilles morts et l'injection de bacilles aviaires vivants d'épreuve a dépassé soixante jours, aucun cas de toxi-infection Yersin ne se produit plus chez les lapins vaccinés et éprouvés avec les doses que nous avons employées Les animaux feront alors des granulies dont ils mourront quand elles frappent des organes essentiels comme par exemple les reins. Sinon les nodules semblent entrer en régression et les lapins meurent tardivement, cachectiques, avec quelques arthrites tuberculeuses isolées aux extrémités. Des cas de ce genre se rencontrent surtout chez des lapins éprouvés six ou sept mois après la vaccination par les bacilles aviaires morts et leur survie est de cinq à sept mois.

La résistance remarquable des lapins préparés par quelques injections de bacilles aviaires morts, vis-à-vis d'une injection intraveineuse d'épreuve de 0,1 à 1 milligramme de bacilles aviaires vivants, pratiquée à un moment pas trop rapproché de la vaccination, dose causant chez les témoins une tuberculose Yersin rapidement mortelle, est attribuée à une désensibilisation de l'organisme des lapins vaccinés par les protéides des bacilles morts qui les ont d'abord sensibilisés. Nous croyons en effet à une désensibilisation plutôt qu'à une immunisation vraie, vu que ces lapins, qui résistent si bien à l'intoxication aiguë de la tuberculose Yersin, peuvent succomber dans la suite à des granulies causées par les bacilles aviaires de l'épreuve et qui peuvent maintenant déployer leur faible virulence. D'autres animaux vaccinés et éprouvés survivent à ces

granulies, apparemment quand celles-ci ont épargné les organes essentiels ; les nodules entrent alors en régression ; mais ces animaux meurent tardivement (cinq à sept mois après l'épreuve) cachectiques, ayant pour toutes lésions quelques arthrites tuberculeuses isolées aux extrémités, et quelques restes de nodules spécifiques aux organes. Cette cachexie finale peut être due à un empoisonnement de l'organisme par les protéides bacillaires provenant des foyers péri-articulaires où se sont cantonnés surtout les bacilles de l'épreuve. Mais elle peut être due également, tout au moins en partie, aux lésions toxiques que les bacilles aviaires morts ont causées, par exemple dans les reins, lors de la vaccination, et qui occasionnent dans certains cas de véritables scléroses interstitielles rénales (14).

(14) Nous sommes redevables à M. Bablet pour l'amabilité qu'il a eue de faire préparer les coupes d'organes dans son service et nous tenons à le remercier de ses utiles conseils.

RÉCEPTIVITÉ DES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE A LA SYPHILIS ET A LA PALLIDOÏDOSE

par A. BESSEMANS et A. DE MOOR.

« Josiah Macy Jr Foundation » et Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de l'Etat à Gand. Directeur : Prof. Dr A. Bessemans.

En dehors du lapin, du cobaye, du rat blanc et de la souris blanche, plusieurs petites espèces animales furent récemment reconnues réceptives à la syphilis, notamment : le Hamster rayé de Chine [*Cricetus grisens*] (infectiosité spécifique du testicule inoculé, des ganglions inguinaux et de l'encéphale) [**28**], le Hamster commun (*Cricetus cricetus* ou *Cricetus frumentarius*) et le Hamster doré de Syrie [*Mesocricetus auratus*] (infectiosité spécifique du testicule inoculé et du testicule non inoculé, de la rate et des ganglions inguinaux et axillaires, avec présence de très nombreux tréponèmes libres dans les deux derniers organes) [**16** et **29**], le Loir commun (*Myoxus glis*) et le Loir du Tyrol [*Dyromys nitedula intermedius*] (infectiosité spécifique du cerveau et d'autres organes internes, ainsi que du sang chez le Loir du Tyrol) [**29**], la Souris domestique (*Mus musculus*) [**29**] (1), le Mulot (*Mus sylvaticus*) [**29**], le Myopotame (*Myocastor coypus*) [**29**] et le Muscardin (*Muscardinus avellanarius*) [**29**].

Des lésions externes syphilitiques se manifestèrent couramment chez le lapin, fréquemment chez le cobaye [**42**], très exceptionnellement chez la souris blanche [**12** et **33**] (2). Pour

(1) Nous avons observé, depuis 1936, quelques cas de syphilis expérimentale inapparente chez la *souris domestique* inoculée sous la peau avec les souches Gand. Les ganglions inguinaux et poplités se montrèrent spécifiquement infectieux, le trentième et le quatre-vingt-dixième jour après la greffe sous la peau de la région génitale.

(2) Nous avons essayé de reproduire des *lésions cliniques chez la souris blanche*. Plus de 500 animaux furent inoculés au moyen de matériel

le reste, l'infection ne prit que sous la *forme inapparente*, sauf chez le loir commun [**29**], où se produisirent des kératites d'inoculation et de métastase, avec présence de tréponèmes typiquement pathogènes dans la cornée et dans les larmes. Les ganglions inguinaux des cobayes inoculés dans la région génitale se révélèrent spécifiquement infectieux pour le lapin et régulièrement tréponémifères [**42** et **45**] ; l'infectiosité spécifique de leurs ganglions axillaires aussi fut démontrée [**10**]. Des syphilomes apparurent également chez de rares lapins qui reçurent dans les testicules, un les ganglions poplités et axillaires [**32**], d'autres les ganglions inguinaux [**33**] de rats blancs infectés dans les testicules ou sous la peau.

Les essais de syphilisation échouèrent chez la Grenouille [**16**], l'Ecureuil (*Sciurus vulgaris*) [**29**], le Spermophile (*Citellus citellus*) [**29**], le Furet (*Putorius furo*) [**29**], la Marmotte des Alpes (*Arctomys marmotta*) [**29**], le Hérisson [*Erinaceus europaeus*] (3), le *Canari* [**29**], la Poule, le Coq et le Pigeon [**6**].

Depuis lors, nous avons pu syphiliser 5 hérissons sur 6 [**9** et **19**] : présence de tréponèmes dans les ganglions inguinaux après un mois et demi à trois mois, et, après douze jours à quatre mois, transfert positif chez le lapin. Chez le seul Surmulot (*Epimys decumanus*) que nous avons tâché de syphiliser, nous avons aussi retrouvé, après soixante-dix jours, des tréponèmes spécifiquement infectieux dans les ganglions inguinaux et axillaires [**7**].

Nous avons établi enfin [**11** et **19**] la grande sensibilité, à la syphilis, du hamster commun et du hamster doré Les résultats furent positifs, au total, respectivement chez 7 sur 7 et chez 15 sur 17 animaux (4). Des tréponèmes furent trouvés au fond noir : après trois mois, dans les ganglions inguinaux et

varié (syphilomes et ganglions syphilisés de lapin et chancres humains), par scarification dans la région génitale ou périnéale, sous ou dans la peau du même endroit et ailleurs. Près de 100 de ces souris avaient d'abord été sensibilisées au sérum de cheval. Tous nos efforts furent vains. Ainsi donc, d'accord avec tous les auteurs et notamment de Karrenberg qui expérimenta sur 700 animaux [**30**], la syphilis à manifestation clinique demeure un phénomène rarissime chez la souris.

(3) Jahnel (F.). Communication personnelle.

(4) A la dix-huitième ligne de notre note à la Soc. de Biol. [**19**], au lieu de « 17 sur 18 », il faut lire « 15 sur 17 ».

axillaires du hamster commun ; chez le hamster doré, après vingt-sept jours dans les ganglions poplités, après trois mois à deux cent sept jours dans les inguinaux, après cent cinquante à deux cent quatorze jours dans les axillaires, après cent quatre-vingt-huit jours dans le cerveau, après cent quatre-vingt-huit à deux cent quatorze jours dans la rate. L'infectiosité spécifique pour le lapin fut constatée : chez le hamster commun, après cinquante et un jours à dix mois pour les ganglions inguinaux et axillaires, la rate, le testicule inoculé et le testicule non inoculé ; chez le hamster doré, après dix jours à dix mois, pour les mêmes ganglions et les poplités, la rate et l'encéphale. En ce qui concerne ce dernier organe chez le hamster doré, 3 animaux sur 5 furent trouvés positifs, dont 1 par examen au fond noir et transfert au lapin, les 2 autres par seul transfert ; chez les 2 animaux non trouvés atteints, nous n'eûmes recours qu'au transfert.

Nous n'avons pas réussi à syphiliser le loir commun le muscardin, l'écureuil et le spermophile [9].

Toutes nos nouvelles tentatives, chez ces espèces animales et les autres, furent des greffes de fragments de syphilomes testiculaires de lapin (souches Gand) sous la peau de la région génitale Tous les succès, auxquels ces tentatives donnèrent lieu, ne consistèrent que dans la production de syphilis inapparente.

La spirochétose spontanée du lapin, découverte par Ross [**38**], Bayon [**2**] et Arzt et Kerl [**1**], fut observée en Belgique dès 1927 [**4**]. Nous avons proposé, pour cette affection, le nom, mieux approprié, de pallidoïdose [**15**]. Nous avons décrit de nouvelles lésions, qu'elle provoque chez le lapin [**41**, **20, 21, 15, 23** et **22**]. L'agent étiologique, le tréponème « pallidoïde », fut mis en évidence, chez des lapins atteints ou guéris de pallidoïdomes testiculaires, dans les ganglions inguinaux, poplités et axillaires [**17**], dont nous avions démontré l'*infectiosité spécifique* [**21**]. Nous avons enfin signalé l'existence [**18**] de la *pallidoïdose inapparente* chez le lapin, chez le cobaye (2 animaux sur 4, transfert positif, après quarante et un jours et quatre-vingt-dix jours, de 3 ganglions inguinaux sur 7), chez la souris blanche (1 animal sur 4, transfert

positif, après cinq jours, de 2 ganglions inguinaux et de 4 axillaires sur 20 ganglions divers), chez le rat blanc (1 animal sur 1, transfert positif, après cinq jours, de 1 ganglion inguinal sur 1), et chez le hamster commun (1 animal sur 1, transfert positif, après quarante-deux jours, de 2 ganglions inguinaux sur 2 inguinaux et 4 axillaires).

Les données complémentaires, que rapporte le présent travail, concernent la réceptivité, à la syphilis, du cobaye, du rat blanc, du hamster doré, du loir commun, du hérisson et du spermophile ; ainsi que celle, à la pallidoïdose, du lapin, du cobaye, du rat blanc, du hamster doré et du hérisson. Les inoculats furent des fragments de syphilomes ou de pallidoïdomes testiculaires du lapin (souches Gand) Ils furent greffés chez le lapin dans les testicules et chez les autres animaux sous la peau de la région génitale. Sauf l'apparition de lésions testiculaires caractéristiques chez le lapin (avec présence de tréponèmes), le contrôle fut effectué, après des temps variables, soit par ultranumération homogène [44, 5 et 26], soit par transfert, dans les testicules de lapins neufs, d'organes ou de fragments d'organes, de 1/2 à 3 cent. cubes de sang (tel quel avant la coagulation ou citraté), ou d'émulsions-mères [44, 5 et 26] en quantités décroissantes.

En dehors du lapin et d'un cobaye (Ca 55), aucun animal ne réagit par des lésions cliniques. Nombreux, par contre, furent ceux qui accusèrent une infection occulte persistante. L'ensemble de ces résultats est consigné dans les tableaux annexés, qu'on peut résumer comme il suit.

Abréviations usitées : P, positif ; N, négatif, c'est-à-dire absence de signes cliniques de syphilis ou de pallidoïdose, après cinq mois, chez les lapins témoins, avec contrôle, dans certains cas, par transfert des ganglions poplités ; ?, incertain en raison du résultat négatif ou douteux de l'examen par ultranumération homogène, ou de la trop grande précocité de la mort accidentelle du lapin témoin.

A. — Réceptivité a la syphilis.

1. Cobaye (tableau I). — Chez 4 animaux infectés depuis sept à quatre-vingts jours et dont 1 portait un chancre scrotal (Ca 55), les ganglions inguinaux, les ganglions axillaires, un

TABLEAU I. — **Réceptivité du cobaye à la syphilis.**

MARQUE et numéro d'ordre (1)	FORME CLINIQUE de l'affection	AGE de l'infection (en jours)	ORGANES ET TISSUS transférés	RÉSULTAT des transferts
Ca 53 . .	Asymptomatique.	7	Ganglions inguinaux	P
			Ganglions axillaires	N
			Sang pur (3 cent. cubes)	N
			Rate.	N
Ca 54 . .	Asymptomatique.	15	Ganglions inguinaux	P
			Ganglions axillaires	N
			Sang pur (2 cent. cubes).	N
			Rate.	N
Ca 55 . .	Chancre scrotal (contemporain des transferts).	23	Ganglions inguinaux	P
			Ganglions axillaires	P
			Sang pur (2 cent. cubes).	P
			Rate.	P
Ca 56 . .	Asymptomatique.	80	Ganglions inguinaux	P
			Ganglions axillaires.	P
			Sang pur (1 cent cube).	?
			Rate.	N

(1) Les 41 premiers cas ont été décrits par Van Haelst [**41** et **44**], et les 11 suivants par nous-mêmes et De Regge [**10**].

fragment de rate et 1 à 3 cent. cubes de sang pur furent examinés par transfert. Chaque fois, les *ganglions inguinaux* furent trouvés atteints. Tous les autres transferts aussi furent positifs chez le cobaye porteur du chancre, où la généralisation de l'infection fut donc manifeste. Ce fut la première fois que, chez le cobaye syphilisé, l'infectiosité spécifique des *ganglions axillaires*, du *sang* et de la *rate* fut établie.

2 RAT BLANC (tableau II). — 5 animaux, infectés depuis sept à trois cent quatre-vingt-quatre jours. Les transferts furent positifs : chaque fois avec les *ganglions inguinaux*, deux fois avec les *ganglions axillaires*, trois fois avec la *rate* (dont une fois après sept jours déjà), une fois avec le cerveau (après trois cent cinquante jours). Certains de ces résultats sont nouveaux. Les autres confirment et complètent ceux de nos prédécesseurs [**32** et **33**].

3. HAMSTER DORÉ (tableau III). — Chez 6 sur 16 animaux, infectés depuis vingt-six à deux cent quatorze jours (Mcr 18, Mcr 21, Mcr 23, Mcr 25, Mcr 28 et Mcr 30), il fut procédé à

TABLEAU II. — **Réceptivité du rat blanc à la syphilis.**

MARQUE et numéro d'ordre	AGE de l'infection (en jours)	ORGANES ET TISSUS transférés	RÉSULTAT des transferts
Ra 1	7	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	?
		Sang pur (3 cent. cubes).	?
		Rate.	P
Ra 2	15	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	P
		Sang pur (2 cent. cubes).	N
		Rate.	N
Ra 3	43	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	P
		Sang pur (2 cent. cubes).	N
		Rate.	N
Ra 4	350	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	N
		Sang pur (1 cent. cube).	N
		Rate.	P
		Reins.	N
		Cerveau.	P
Ra 5	384	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	N
		Sang pur (2 cent. cubes)	N
		Rate.	P
		Cerveau.	N

l'examen de deux ou plusieurs des organes et tissus suivants : ganglions inguinaux, ganglions axillaires, ganglions poplités, ganglions rétrocæcaux, sang pur, rate, reins, foie, cœur, cerveau. Chaque animal fut trouvé atteint. La syphilisation fut démontrée : quatre fois sur quatre pour les *ganglions inguinaux*, une fois sur deux pour les *axillaires*, deux fois sur deux pour les *poplités*, deux fois sur trois pour la *rate*, une fois sur une pour les *ganglions rétrocæcaux*, une fois sur une pour le cerveau. De nombreux tréponèmes furent décelés dans la plupart des ganglions et dans la seule rate soumis à l'ultranumération homogène. Les résultats de cette numération concordent avec ceux de nos dénombrements antérieurs [**11**]. Ils donnèrent, en effet, comme teneur minimum approximative en tréponèmes libres par **200** milligrammes de tissu : **54.900** et **106.500** ou **137.400** après cent vingt et un et deux cent sept jours pour les ganglions inguinaux, **75.600** après vingt-six jours pour les ganglions poplités, **171.900** et **549.900** après cent vingt et un et deux

TABLEAU III. — **Réceptivité du hamster doré à la syphilis.**

MARQUE ET NUMÉRO D'ORDRE (1)	AGE DE L'INFECTION (en jours)	ORGANES et tissus examinés	EXAMEN			
			Par ultranumération homogène (nombre approximatif minimum de tréponèmes libres par 200 milligr. de tissu)	Par transfert		
				Quantités transférées		Résultat
				Émulsion à 200 milligr. par cent. cube	Nombre approximatif minimum de tréponèmes libres	
Mcr 18	26	Ganglions poplités.	75 600			
Mcr 19	62	Cerveau.		5/10		P
				6/10		P
Mcr 20	65	Cerveau.		0,5		N
				1/20		N
				1/200		N
				1/2 000		N
				1/20 000		N
				1/200.000		N
Mcr 21	85	Ganglions poplités.				P
		Ganglions mésentériques (iléocæcaux).				P
		Sang pur (0 c. c. 5).				N
		Rate.				N
		Foie				N
		Cerveau.				P
Mcr 22	109	Cerveau		5/10		N
				1/10		N
				1/100		N
				1/1.000		N
				1/10.000		N
				1/100.000		N
Mcr 23	121	Ganglions inguinaux	54 900			
		Ganglions axillaires.	171.000			
Mcr 24	188	Cerveau	170			
Mcr 25	188	Ganglions inguinaux		0,5		P
		Rate.		0,5		P
		Foie.		1		N
		Cerveau.		1		N
Mcr 26	203	Cerveau.	?			
Mcr 27	204	Cerveau.	133			
Mcr 28	207	Ganglion inguinal droit.	106 500			
		Ganglion inguinal gauche.	137.400			
Mcr 29	213	Cerveau.	647	0,15	97	P
Mcr 30	214	Ganglions axillaires.	549.900	3/400	3.900	P
				1/800	650	N
				1/8.000	65	N
				1/80.000	6,5	N
		Rate.	17 100	1/10	1.710	P
				1/20	85	P
				1/2 000	8	N
				1.20 000	0,8	N

(1) Les 17 premiers cas furent décrits ailleurs [**16**, **11** et **19**]. Les hamsters Mcr 24, Mcr 26, Mcr 27, Mcr 29 et Mcr 33, dont nous n'avons étudié par ultranumération homogène qu'un petit fragment encéphalique, furent confiés au Professeur Levaditi (Paris) pour examen par imprégnation argentique.

Marque et numéro d'ordre	Age de l'infection (en jours)	Organes et tissus examinés	Examen			
			Par ultranumération homogène (nombre approximatif minimum de tréponèmes libres par 200 milligr. de tissu)	Par transfert		
				Quantités transférées		Résultat
				Emulsion à 200 milligr. par cent. cube	Nombre approximatif minimum de tréponèmes libres	
Mcr 30 (*suite*).		Reins.		0,5		N
				1/200		N
				1/2 000		N
				1/20 000		N
		Foie.		0,5		N
				1/200		N
				1/2 000		N
				1/20 000		N
		Cœur.		0,5		N
				1/200		N
				1/2 000		N
				1/20.000		N
Mcr 31	240	Écorce grise	1.140	5/10	570	N
				1/12	95	N
				1/125	9	N
				1/1 250	1	N
		Corps strié	2 100	1/10	210	N
				1/100	21	N
				1/1.000	2	N
Mcr 32	283	Cerveau		4/10		N
Mcr 33	466	Cerveau	106	0,15	16	N

cent quatorze jours pour les ganglions axillaires, 17.100 après deux cent quatorze jours pour la rate.

Chez les 10 autres hamsters dorés, infectés depuis soixante-deux à quatre cent soixante-six jours (Mcr 19, Mcr 20, Mcr 22, Mcr 24, Mcr 26, Mcr 27, Mcr 29 et Mcr 31 à 33), l'encéphale seul fut examiné et le résultat fut positif : chez Mcr 19 et Mcr 29 par transfert respectivement après soixante-deux et deux cent treize jours, et chez Mcr 24, Mcr 27, Mcr 29, Mcr 31 et Mcr 33 par ultranumération homogène respectivement après cent quatre-vingt-huit, deux cent quatre, deux cent treize, deux cent quarante et quatre cent soixante-six jours. Ainsi, au total, le cerveau fut trouvé envahi chez 7 animaux sur 11 (après soixante-deux à quatre cent soixante-six jours).

Les cas de Mcr 33 et Mcr 31 peuvent paraître surprenants. Car, malgré la présence d'au moins 16 et 570 tréponèmes libres dans leurs inoculats encéphaliques respectifs, les transferts ne provoquèrent pas de syphilome. Le nombre de tréponèmes inoculés fut-il insuffisant, ce qu'on pourrait supposer en admettant que le seuil de l'infectiosité de la variété encéphalique du hamster doré soit relativement élevé ? Ou les deux hamsters, dont il s'agit, auraient-ils fait une syphilis inapparente ? La dernière hypothèse ne fut pas contrôlée, les deux animaux étant morts inopinément. Elle nous paraît probable du moins en ce qui concerne Mcr 33, en raison du résultat positif obtenu par le transfert d'un minimum de

TABLEAU IV. — **Virulence spécifique et teneur en tréponèmes du cerveau de hamsters dorés syphilisés.**

Marque et numéro d'ordre	Age de l'infection (en jours)	Examen				Auteurs
		Par ultranumération homogène (1)		Par transfert		
		Teneur approximative minimum en tréponèmes libres (de 200 milligrammes de tissu)	Résultat	Nombre approximatif minimum de tréponèmes libres transférés	Résultat	
Mcr 16	52				P	Bessemans, De Moor et De Regge [11].
Mcr 14	60				N	
Mcr 19	62				P	Bessemans et De Moor (nouvelles données).
Mcr 20	65				N	
Mcr 21	85				P	
Mcr 15	90				N	Bessemans, De Moor et De Regge [11]
Mcr 22	109				N	Bessemans et De Moor (nouvelles données).
Mcr 13	188		P		P	Bessemans, De Moor et De Regge [11].
Mcr 24	188	170	P			Bessemans et De Moor (nouvelles données).
Mcr 25	188				N	
Mcr 26	203	?	?			
Mcr 27	204	133	P			
Mcr 29	213	647	P	97	P	
Mcr 31	240	1 620	P	570	N	
Mcr 32	283				N	
Mcr 5	300				P	Bessemans, De Moor et De Regge [11].
Mcr 33	466	106	P	16	N	Bessemans et De Moor (nouvelles données)

(1) Ou simple examen au fond noir (Mcr 13).

97 tréponèmes encéphaliques provenant de Mcr 29, c'est-à-dire d'un nombre de spirochètes inférieur à celui de l'inoculat originaire de Mcr 33. Mais le problème demande de nouvelles recherches. Nous les avons entreprises.

Si nous réunissons tous les résultats que nous avons obtenus jusqu'à ce jour avec le cerveau de hamsters syphilisés [renvoi bibliographique numéro 8 et présent travail], nous pouvons dresser le tableau IV, qu'il y a lieu de comparer avec le tableau V relatif à la richesse en tréponèmes libres de l'encéphale de souris blanches syphilisées avec les mêmes sou-

TABLEAU V. — **Présence de tréponèmes dans le cerveau de souris blanches syphilisées.**

MARQUE et numéro d'ordre	AGE de l'infection en jours	NOMBRE de fragments examinés	NOMBRE de préparations examinées	NOMBRE trouvé de tréponèmes libres	AUTEURS
a) Examen ordinaire au fond noir :					
Mu 1. . .	417	6	45	2	Bessemans et De Moor [8]
Mu 2. . .	427	6	16	5	
Mu 2. . .	432	6	28	2	

MARQUE et numéro d'ordre	AGE DE L'INFECTION en jours	POIDS de la masse encéphalique (un ou plusieurs cerveaux) en milligrammes	NOMBRE DE DISQUES examinés	NOMBRE TROUVÉ de tréponèmes libres	TENEUR approximative en tréponèmes libres: Par 200 milligrammes de tissu	TENEUR approximative en tréponèmes libres: Par organe	AUTEURS
b) Ultranumération homogène :							
Mu 4	189	390	17	0	?	?	Bessemans, Van Haelst et De Wilde [43, 42 et 25].
Mu 5	192	450	17	1	111	250	
Mu 6	265	430	2,5	0	?	?	
Mu 7	425	355	3,5	2	104	183	
Mu 8	471	455	38	1	89	202	
Mu 9 à Mu 13 .	106	2.200	23	1	145	326	Bessemans et De Moor [8].
Mu 14 à Mu 18 .	138	2.050	23	1	144	295	Bessemans et De Moor (nouvelles données).
Mu 19 à Mu 23	375	1.340	21	1	162	217	

ches (5). Il résulte de cette comparaison que, *de même que, chez ces souris, la virulence du cerveau et sa teneur en tréponèmes libres s'observent respectivement toujours et presque toujours* (présence de tréponèmes chez 6 sur 8 animaux ainsi que chaque fois dans 3 mélanges de 5 cerveaux chacun), *de même l'encéphale du hamster doré, syphilisé par la voie hypodermique génitale, se montre assez fréquemment envahi par le germe étiologique à partir d'une couple de mois après la contamination* (sur 17 animaux, présence de tréponèmes chez 6, et infectiosité spécifique chez 4 autres)

D'ailleurs, nous avons rappelé plus haut que l'infectiosité spécifique de l'encéphale, après syphilisation, fut également mise en évidence chez le hamster rayé de Chine [**28**] et chez le loir du Tyrol [**29**]. Tout cela souligne l'intérêt que présente une série de petits rongeurs de laboratoire pour l'étude de la neurosyphilis.

4. Loir commun, hérisson et spermophile (tableau VI). — Par opposition aux résultats de Jahnel avec la souche Nichols [**29**], 2 loirs communs sur 2 ne se montrèrent pas réceptifs aux souches Gand, mais bien 2 hérissons sur 2. Nos nouveaux succès chez le hérisson furent observés, non seulement, comme antérieurement [**7** et **15**], avec les *ganglions inguinaux* de chaque animal (cette fois-ci après dix jours et neuf mois et demi), mais encore avec les reins de l'un d'eux. Le hérisson aussi est donc très réceptif à la syphilis (en tout 7 cas sur 8), et l'infection peut y donner lieu à une véritable *généralisation*. Par contre et conformément à nos résultats précédents [**9**], nos tentatives de syphilisation chez 3 sur 3 nouveaux spermophiles ne connurent pas plus de succès que chez nos 2 nouveaux loirs.

B. — Réceptivité a la pallidoïdose.

1. Lapin (tableau VII). — Différents ganglions lymphatiques furent examinés chez 5 animaux, dont 2 étaient por-

(5) La plus grande partie de ce tableau V fut déjà publiée [**8**]. Nous l'avons complété par les résultats de recherches récentes, inédites.

TABLEAU VI. — Réceptivité, à la syphilis, du loir commun, du hérisson et du spermophile.

MARQUE et numéro d'ordre (1)	AGE de l'infection en jours	ORGANES et tissus transférés	RÉSULTAT des transferts
		a) *Loir commun* :	
My 3.	84	Ganglions mésentériques.	N
		Rate.	N
		Reins.	N
		Foie.	N
My 4.	214	Ganglions inguinaux.	N
		Ganglions axillaires.	N
		Sang pur (1 cent. cube).	N
		Rate.	N
		Reins.	N
		Foie.	N
		Cerveau.	N
		b) *Hérisson* :	
Er 7.	10	Ganglion inguinal droit.	P
		Ganglion inguinal gauche	P
Er 8.	287	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires	N
		Sang pur (2 cent. cubes).	N
		Rate.	N
		Reins.	P
		Cerveau.	N
		c) *Spermophile* :	
Ci 4.	123	Ganglion inguinal droit	N
		Ganglion inguinal gauche.	N
		Sang pur (1 cent. cube).	N
		Rate.	N
		Reins.	N
		Foie	N
		Cerveau.	N
Ci 5.	168	Ganglions inguinaux.	N
Ci 6.	168	Ganglions inguinaux.	N

(1) Les autres cas furent décrits ailleurs (9 et 19).

leurs de nodules pallidoïdes dans un testicule, les 3 autres étant guéris de lésions analogues depuis un à treize mois. Dans chaque cas, le transfert des *ganglions axillaires*, des *ganglions mésentériques* (rétrocæcaux) ou des deux, fut positif chez le lapin. Ce qui confirme que, chez de tels animaux, les ganglions axillaires, aussi bien que les inguinaux et les poplités, peuvent héberger l'agent causal et le conserver virulent longtemps. Ce qui montre, par surcroît, que les ganglions

TABLEAU VII — **Infectiosité spécifique des ganglions lymphatiques de lapins atteints ou guéris de pallidoïdomes testiculaires.**

CAS	AGE de l'infection en jours	TEMPS depuis la guérison locale en jours	ETAT CLINIQUE	ORGANES TRANSFÉRÉS	RÉSULTAT des transferts
1 . . .	41		Lésions florides.	Ganglions axillaires.	N
				Ganglions rétrocæcaux.	P
2 . .	127	33	Lésions guéries.	Ganglions axillaires.	P
				Ganglions rétrocæcaux.	N
3 . . .	171		Lésions florides	Ganglion axillaire droit.	P
				Ganglion axillaire gauche	P
4 . .	358	280	Lésions guéries	Ganglions axillaires.	P
				Ganglions rétrocæcaux.	P
5 . .	550	390	Lésions guéries.	Ganglions axillaires.	P
				Ganglions rétrocæcaux.	N

rétrocæcaux également, pourtant profondément logés, peuvent transférer le mal, tant après la guérison des pallidoïdomes depuis plus d'une année que pendant leur floraison.

2. COBAYE (tableau VIII). — Chez 2 animaux sur 9, les *ganglions inguinaux* et au surplus, chez un de ces deux, les *ganglions axillaires* se montrèrent spécifiquement infectieux, respectivement après trente-cinq et cent quatre-vingt-dix-neuf, et après trente-cinq jours. Des résultats positifs analogues furent obtenus antérieurement avec les ganglions inguinaux [**18**]. Le nombre total de cobayes trouvés réceptifs à la pallidoïdose atteint ainsi 4 sur 13.

3. RAT BLANC, HÉRISSON et HAMSTER DORÉ (tableaux IX et X). — Chez 1 rat blanc sur 4, le transfert des *ganglions inguinaux*, après quinze jours, fut positif. Tous les autres transferts furent négatifs, après sept à trois cent cinquante jours. La réceptivité du rat blanc à la pallidoïdose ne paraît donc pas très grande, même si on ajoute au nouveau succès celui déjà signalé [**18**] : en tout, transfert positif de 2 ganglions inguinaux sur 5, après cinq et quinze jours.

Deux hérissons sur 4 furent trouvés positifs. Non seule-

TABLEAU VIII. — **Réceptivité du cobaye à la pallidoïdose.**

MARQUE et numéro d'ordre (1)	AGE de l'infection en jours	ORGANES et tissus transférés	TRANSFERTS	
			Quantité d'une émulsion de 200 milligrammes par centimètre cube en centimètre cube	Résultat
Ca 72 . .	7	Ganglions inguinaux.		N
		Ganglions axillaires.		N
		Sang pur (2 cent. cubes).		N
		Rate.		N
Ca 73 à Ca 75.	12 à 115	Sang pur (1 ou 2 cent. cubes).		N
Ca 76	35	Ganglions inguinaux.		P
		Ganglions axillaires.		P
		Sang pur (1 cent. cube).		N
		Rate.		N
Ca 77 .	67	Ganglion inguinal droit.	1/10	N
			1/25	N
			1/100	N
			1/200	N
			1/2 000	N
			1/20.000	N
		Ganglion inguinal gauche.	1/8	N
			1/400	N
			1/1 000	N
			1/10.000	N
		Ganglions axillaires.	1/200	N
			1/2.000	N
			1/10.000	N
Ca 78	199	Ganglion inguinal droit.		P
		Ganglion inguinal gauche.		N
		Ganglions axillaires.		N
		Rate.		N
Ca 79	279	Ganglions axillaires.		N
		Ganglions poplités.		N
		Rate.	4/10	N
		Reins.	5/10	N
		Cerveau.	1 cent. cube.	N
Ca 80	542	Ganglions inguinaux.		N
		Ganglions axillaires.		N
		Sang pur (3 cent. cubes).		N
		Rate.		N

(1) Les cas 57 à 71 furent décrits ailleurs (**18**).

ment les *ganglions inguinaux* de chaque animal (après cinquante et un et cent dix-huit jours), mais aussi les *ganglions axillaires* et le *sang pur* de l'un d'eux (après cent dix-huit jours) provoquèrent l'apparition d'un pallidoïdome chez le

TABLEAU IX. — **Réceptivité, à la pallidoïdose, du rat blanc et du hérisson.**

MARQUE et numéro d'ordre	AGE de l'infection en jours	ORGANES et tissus transférés	RÉSULTAT des transferts
		a) *Rat blanc* (1) :	
Ra 7	7	Ganglions inguinaux.	N
		Ganglions axillaires.	N
		Sang pur (2 cent. cubes)	N
		Rate.	N
Ra 8	15	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	N
		Sang pur (2 cent. cubes)	N
		Rate.	N
Ra 9	36	Ganglions inguinaux.	N
		Ganglions axillaires.	N
		Rate.	N
Ra 10.	3[illegible]0	Ganglions inguinaux.	N
		Ganglions axillaires	N
		Sang pur (0 c. c. 5).	N
		Sang citraté (0 c. c. 5).	N
		Rate.	N
		Cerveau.	N
		b) *Hérisson* :	
Er 9	[illegible]	Ganglions inguinaux	N
Er 10	5	Ganglions inguinaux.	N
Er 11	[illegible]1	Ganglions inguinaux.	P
Er 12	118	Ganglions inguinaux.	P
		Ganglions axillaires.	P
		Sang pur (1 cent. cube)	P

(1) Le cas 6 fut décrit ailleurs [**18**].

lapin. La réceptivité du hérisson à la pallidoïdose ne fut jamais signalée. Elle semble assez accusée.

Quant au hamster doré, 4 animaux sur 5 furent trouvés positifs, soit par examen au fond noir des *ganglions inguinaux* (Mcr 38), soit par transfert, au lapin, des ganglions inguinaux (Mcr 35, 36 et 38), des *ganglions poplités* (Mcr 34), de la rate (Mcr 34) et du *sang* (Mcr 35). Deux de ces transferts furent effectués après vingt-deux jours ; et, dans un cas, un nombre minimum d'environ 684 tréponèmes inguinaux libres suffit pour transmettre le mal au lapin. C'est aussi la première fois qu'est rapportée la réceptivité, d'ailleurs considérable, du hamster doré à la pallidoïdose.

TABLEAU X. — **Réceptivité du hamster doré à la pallidoïdose.**

MARQUE ET NUMÉRO D'ORDRE	AGE DE L'INFECTION en jours	ORGANES et tissus transférés	EXAMEM			
			Par ultranumération homogène (nombre approximatif minimum de tréponèmes libres par 200 milligrammes de tissu)	Par transfert		
				Quantités transférées		Résultat
				Émulsion à 200 milligrammes par centimètre cube	Nombre approximatif minimum de tréponèmes libres	
Mcr 34	22	Ganglions inguinaux.				N
		Ganglions axillaires.				N
		Ganglions poplites				P
		Rate				P
Mcr 35	68	Ganglions inguinaux.				P
		Sang pur (1 cent. cube)				P
Mcr 37	68	Ganglions inguinaux.				N
Mcr 36	93	Ganglions inguinaux.				P
		Ganglions axillaires.				N
Mcr 38	342	Ganglions inguinaux.	3 420	2/10	684	P
		Ganglions axillaires.		2/10		N
		Rate		1		N
		Reins.		1		N
		Foie.		1		N
		Cerveau.		1		N

CONCLUSIONS.

Il ressort d'autres travaux [**28** et **29**] que la syphilis inapparente peut atteindre le hamster rayé de Chine, le loir commun, le loir du Tyrol, la souris domestique, le mulot, le myopotame et le muscardin ; et que le loir commun peut faire des kératites syphilitiques d'inoculation et de métastase.

Le tableau XI (6) condense l'essentiel de nos propres essais relatifs à la réceptivité d'une série de petits animaux de laboratoire à la syphilis et à la pallidoïdose (souches Gand). L'en-

(6) Ce tableau, dressé d'après le présent mémoire, enrichi de trois résultats inédits d'expériences chez la souris blanche dont le protocole fut exposé [**8**] et des publications antérieures de Bessemans et ses élèves [**3**, **7**, **13**, **14**, **24**, **25**, **42** et **43**], devrait être complété par les données, relatées plus haut, de Hu Ch'uan K'uei et Pearce [**28**] et Jahnel [**29**], ainsi que par celles de nombreux auteurs particulièrement en ce qui concerne la syphilis du lapin, du cobaye et de la souris blanche.

Tableau XI. — Dates, après l'inoculation, auxquelles notre examen fut positif (1).

ORGANES ET TISSUS	SYPHILIS		PALLIDOIDOSE	
	Présence de tréponèmes	Infectiosité pour le lapin	Présence de tréponèmes	Infectiosité pour le lapin
		1. Lapin :		
Ganglions inguinaux. . .	41e au 223e jr.	Dès 30e min.	50e au 253e jr.	30e au 112e jr.
Ganglions axillaires . . .		185e au 256e jr.	65e jr.	127e au 350e jr.
Ganglions poplités .	41e au 223e jr.	Dès 30e jr.	60e au 351e jr.	76e au 510e jr.
Ganglions mésentériques.				41e au 358e jr.
Cerveau		172e et 202e jr.		
		2. Cobaye (2) :		
Ganglions inguinaux. . .	15e h. au 570e jr.	7e au 80e jr.		35e au 199e jr.
Ganglions axillaires . . .		23e au 90e jr		35e jr.
Sang.		23e jr.		
Rate.		23e jr.		
		3. Souris blanche (3) :		
Ganglions inguinaux. . .	13e au 425e jr.	Dès 13e jr.		[illegible] jr
Ganglions axillaires . .	13e au 425e jr.	Dès 13e jr.		[illegible] jr
Ganglions poplités. . . .	13e au 425e jr.	Dès 13e jr.		
Peau.		576e jr (4).		
Muqueuse nasale . .	571e jr.			
Muqueuse buccale . .	571e jr.			
Rate	30e au 561e jr.	13e au 70e jr.		
Reins	576e jr.			
Cœur	561e jr.	561e jr (4)		
Testicule. . . .	576e jr.	576e jr (4)		
Langue	576e jr			
Cerveau.	106e au 471e jr.	Dès 85e jr.		
		4. Rat blanc :		
Ganglions inguinaux. .		7e au 384e jr.		5e et 15e jr.
Ganglions axillaires . . .		15e et 43e jr.		
Rate		7e au 384e jr.		
Cerveau		350e jr.		
		5. Hamster commun :		
Ganglions inguinaux . .	90e jr.	10e au 300e jr.		42e jr.
Ganglions axillaires . . .	90e jr.	10e au 300e jr.		
Rate.		10e au 300e jr		
Testicule inoculé		10e au 300e jr		
Testicule non inoculé . .		10e au 300e jr.		

(1) Dans ce tableau, min., h. et jr. signifient minute, heure et jour. Les secondes dates sont les dernières auxquelles nos examens furent faits. Lorsqu'une seule est indiquée avec le préfixe « dès », c'est que la positivité fut observée, au cours de plusieurs mois, durant toute la vie de l'animal.

(2) Chez le *cobaye syphilisé*, les ganglions poplités furent trouvés spécifiquement infectieux pour le lapin, après quarante-sept et soixante-seize jours, par Kolle et Evers [31].

(3) La présence de tréponèmes fut signalée, chez la *souris blanche syphilisée*, dans le sang par Tani et Ogiuti [[illegible]], dans la peau par Cerutti [27], et dans presque tous les organes et tissus par Stroesco et Vaisman [[illegible]] et par Levaditi et ses collaborateurs [34 à 37].

(4) Résultats inédits.

ORGANES ET TISSUS	SYPHILIS		PALLIDOÏDOSE	
	Présence de tréponèmes	Infectiosité pour le lapin	Présence de tréponèmes	Infectiosité pour le lapin
6. *Hamster doré* :				
Ganglions inguinaux. . .	90e au 207e jr.	10e au 300e jr	342e jr.	68e au 342e jr.
Ganglions axillaires . . .	121e au 214e jr.	10e au 300e jr.		
Ganglions poplités . . .	26e et 27e jr.	10e au 300e jr.		22e jr.
Ganglions rétrocæcaux. .		85e jr.		
Sang				68e jr.
Rate.	188e au 214e jr.	10e au 300e jr.		22e jr.
Cerveau	188e au 466e jr.	52e au 300e jr		
7. *Hérisson* :				
Ganglions inguinaux. . .	45e au 90e jr.	12e au 287e jr.		51e et 118e jr.
Ganglions axillaires . . .				118e jr.
Sang.				118e jr.
Reins		287e jr		
8. *Surmulot* :				
Ganglions inguinaux. . .	70e jr	70e jr.		
Ganglions axillaires . . .	70e jr.	70e jr.		
9. *Souris domestique* :				
Ganglions inguinaux. .		30e et 90e jr.		
Ganglions poplités. . . .		30e et 90e jr.		

semble de nos résultats actuels, qu'il faut considérer plutôt comme restant en-dessous de la réalité (7), comporte les points qui suivent.

1° La syphilis du lapin peut envahir non seulement les ganglions inguinaux, axillaires et poplités, mais aussi le cerveau (ce dernier après cent soixante-douze et deux cent deux jours] (8).

(7) Leur positivité, en effet, constitue un minimum, parce que tous nos résultats négatifs d'inoculation primaire ne furent pas contrôlés par transfert ganglionnaire, et que les résultats négatifs de l'ultranumération homogène n'impliquent pas nécessairement l'absence de tréponèmes.

(8) Chez des lapins avec manifestations syphilitiques cutanées, Cerutti [27] trouve le tréponème non seulement dans les ganglions et les vaisseaux, mais ausi dans des lésions cérébrales de l'écorce et des noyaux de la base. Les éléments filiformes et les granulations argento-

2° Le lapin porteur ou guéri de pallidoïdomes testiculaires peut héberger l'agent causal et le conserver virulent longtemps dans les ganglions inguinaux, axillaires, poplités et rétrocæcaux (respectivement jusqu'au deux cent cinquante-troisième, cinq cent cinquantième, cinq cent dixième et trois cent cinquante-huitième jour).

3° La souris blanche est sensible à la pallidoïdose (persistance du germe, après cinq jours, dans les ganglions inguinaux et axillaires); syphilisée, elle montre le tréponème régulièrement, à partir de certains moments, dans la plupart des organes et tissus, y compris le cerveau (dans celui-ci nous l'avons vu, au fond noir, six fois sur 8 organes examinés séparément, et trois fois sur 3 mélanges de 5 organes chacun).

4° Après infection par la voie génitale hypodermique, la syphilis et la pallidoïdose peuvent se retrouver par examen au fond noir ou transfert au lapin, après des temps variables indiqués au tableau précité :

a) Chez le cobaye, la première dans les ganglions inguinaux et axillaires, le sang et la rate, la seconde dans les ganglions inguinaux et axillaires ;

b) Chez le rat blanc, la syphilis dans les ganglions inguinaux et axillaires, la rate et l'encéphale, la pallidoïdose dans les ganglions inguinaux ;

c) Chez le hamster commun, la syphilis dans le testicule inoculé, le testicule non inoculé, les ganglions inguinaux et axillaires et la rate, la pallidoïdose dans les ganglions inguinaux ;

d) Chez le hamster doré, la syphilis dans les ganglions inguinaux et poplités (9), les ganglions axillaires et rétrocæcaux, la rate et le cerveau, la pallidoïdose dans les ganglions inguinaux et poplités, le sang et la rate ;

philes, présents dans les viscères, sont considérés par l'auteur comme des formes tréponémiques dégénératives d'involution.

Récemment encore, Benetazzo obtient plusieurs résultats positifs en transférant la substance cérébrale et en particulier le nerf et le chiasma optiques de lapins syphilisés par la voie intra-oculaire au moyen de la souche Truffi (*Atti Soc. ital. Dermatol. e Sifilogr.*, **17**, 1938, p. 604).

(9) Dans ces deux ganglions, la présence de tréponèmes fut aussi révélée par imprégnation argentique [**11**].

e) Chez le hérisson, la syphilis dans les ganglions inguinaux et les reins, la pallidoïdose dans les ganglions inguinaux et axillaires et le sang ;

f) Chez le surmulot, la syphilis dans les ganglions inguinaux et axillaires ;

g) Chez la souris domestique, la syphilis dans les ganglions inguinaux et poplités.

5° A part certaines lésions syphilitiques cliniques chez le lapin, le cobaye et la souris blanche, ainsi que certaines manifestations pallidoïdes cliniques chez le lapin, les deux tréponémoses considérées chez les diverses petites espèces animales se présentent sous leur forme inapparente et peuvent conduire à une véritable généralisation.

6° Des tréponèmes libres furent mis en évidence, grâce au fond noir, dans divers ganglions du lapin et du hamster doré atteints de pallidoïdose, ainsi que dans divers organes de la plupart des animaux atteints de syphilis (détails aux tableaux).

7° Dans cette dernière affection, non seulement le cerveau du lapin, mais encore celui du rat blanc se montrèrent spécifiquement infectieux ; la même infectiosité fut non seulement quasi constante pour l'encéphale de la souris blanche, mais fréquente aussi pour celui du hamster doré (chez 6 sur 14 animaux).

8° Dans la syphilis, chez le hamster doré comme chez la souris blanche, l'examen au fond noir révéla presque toujours la présence de tréponèmes libres dans le cerveau (chez 6 sur 7 animaux) ; ici comme là ces germes parurent toujours fort clairsemés.

9° Chez le hamster doré syphilitique, un minimum approximatif de 85 tréponèmes spléniques [11] et un autre de 97 tréponèmes encéphaliques permirent de transmettre le mal au lapin ; ce qui semble indiquer que la virulence de ces deux variétés tréponémiques est relativement élevée.

10° Chez la même espèce animale, infectée de syphilis, le dénombrement des spirochètes et la durée de l'incubation des syphilomes provoqués font ranger, par ordre croissant d'infectiosité, le cerveau, la rate et les ganglions ; de plus, la

syphilisation en série [11] et les résultats de l'ultranumération homogène plaident en faveur d'une multiplication des tréponèmes dans le système lymphatique.

11° Cette multiplication, le taux de la réceptivité, la fréquence de l'envahissement du cerveau et l'abaissement du seuil infectieux des tréponèmes spléniques et encéphaliques font du hamster doré (10) un nouvel animal de choix pour l'étude de la syphilis.

12° La réceptivité, à la syphilis (souches Gand), du loir commun, du muscardin, de l'écureuil et du spermophile, ne put pas être démontrée.

13° De nouvelles recherches s'imposent sur l'infectiosité spécifique du sang dans la syphilis et la pallidoïdose ; car nos résultats positifs dans la syphilis chez le cobaye (vingt-troisième jour) et dans la pallidoïdose chez le hamster doré (soixante-huitième jour) et le hérisson (cent dix-huitième jour), joints à ceux d'autres auteurs chez l'homme, le lapin, la souris blanche et le loir du Tyrol (11), soulèvent l'objection de la possibilité d'une cause d'erreur dans l'interprétation des résultats positifs obtenus par transferts d'organes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Arzt (L.) et Kerl (W.). *Dermatol. Zeitschr.*, **32**, 1921, p. 199.

[2] Bayon (H.). *Brit med. Journ.*, **2**, 1913, p. 1159.

[3] Bessemans (A.). *Giorn. Batt. e Immun.*, **14**, 1935, p. 1309 ; *Urol. a. cut. Rev.*, **39**, 1935, p. 534.

[4] Bessemans (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1928, p. 331.

[5] Bessemans (A.). *Bull. Soc. franç. Dermatol. et Syphiligr.*, n° 6, 1936, p. 1084.

[6] Bessemans (A.). *Rev. belge Sc. méd*, **9**, 1937, p. 569 ; *Ann. intern. Med.* (amér.), **11**, 1938, p. 1933.

[7] Bessemans (A.) et Asaert (L.). *Steunf. Fac. Gen. Univ. Gent.*, n° 3, 1934 ; *Rev. belge Sc. méd.*, **8**, 1936, p. 525.

[8] Bessemans (A.) et De Moor (A.). *Dermatol. Zeitschr.*, **75**, 1937, p. 357 ; *Bull. Soc. franç. Dermatol. et Syphiligr.*, n° 4, 1937, p. 483.

(10) Et aussi, vu leur réceptivité, du hamster commun et du hérisson ; il en est de même, en ce qui concerne ces trois espèces animales, pour la pallidoïdose.

(11) Nous reviendrons bientôt sur cette question.

[9] Bessemans (A.) et De Moor (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 501.
[10] Bessemans (A.), De Moor (A.) et De Regge (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 444.
[11] Bessemans (A.), De Moor (A.) et De Regge (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 503.
[12] Bessemans (A.) et De Potter (Fr.). *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 818 ; **107**, 1931, p. 279.
[13] Bessemans (A.) et De Potter (Fr.). *Bull. Acad. Méd.* (Paris), **109**, 1933, p. 908 ; **112**, 1934, p. 132.
[14] Bessemans (A.), De Potter (Fr.) et Thiry (U.). *Arch. intern. Méd. exp.*, **6**, 1931, p. 443 ; *Acta brev. neerl.*, **1**, 1931, p. 115.
[15] Bessemans (A.) et De Wilde (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1935, p. 1232.
[16] Bessemans (A.) et De Wilde (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 326.
[17] Bessemans (A.) et De Wilde (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 440.
[18] Bessemans (A.) et De Wilde (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 264.
[19] Bessemans (A.), De Wilde (H.) et De Moor (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 376.
[20] Bessemans (A.) et Van Canneyt (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 1929, p. 951 ; **105**, 1930, p. 214 ; **107**, 1931, p. 282 ; **108**, 1931, p. 440.
[21] Bessemans (A.) et Van Canneyt (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **108**, 1931, p. 443.
[22] Bessemans (A.) et Van Canneyt (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 1931, p. 69 ; **127**, 1937, p. 359.
[23] Bessemans (A.), Van Canneyt (J.) et Van Thielen (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1935, p. 1634.
[24] Bessemans (A.) et Van Haelst (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 1934, p. 1395.
[25] Bessemans (A.), Van Haelst (J.) et De Wilde (H.). *Bull. Ass. Dipl. Micr. Fac. Pharm. Nancy*, n° 9, 1934, p. 7 ; *Wissensch. Woche Frankfurt a. M.*, **3**, 1934, p. 194 ; *Amer. Journ. Syph. a. Neurol.*, **19**, 1935, p. 161.
[26] Bessemans (A.), Van Haelst (J.), De Wilde (H.) et Janssens (P.). Ces *Annales*, **57**, 1936, p. 5 ; Bessemans (A.) et De Wilde (H.). *Rev. belge Sc. méd.*, **10**, 1938, p. 447 ; *Brit. Journ. ven. Dis.*, **15**, 1939, p. 222.
[27] Cerutti (P.). *Giorn. Ital. di Dermatol. e Sifilol.*, **79**, 1938, p. 527.
[28] Hu Ch'uan K'uei et Pearce (L.). *Proc. Soc. experim. Biol. a. Med.*, **29**, 1932, p. 1154.
[29] Jahnel (F.). *Arch. f. Dermatol. u. Syph.*, **171**, 1935, p. 187 ; *Amer. Journ. Syph., Gon. a. ven. Dis.*, **21**, 1937, p. 18.
[30] Karrenberg (C. L.). *Arch. f. Dermatol. u. Syph.*, **165**, 1932, p. 585.
[31] Kolle (W.) et Evers (E.). *Deutsche med. Wochenschr.*, n° 26, 1926, p. 1075.
[32] Kolle (W.) et Schlossberger (H.). *Deutsche med. Wochenschr.*, **52**, 1926, p. 1245.
[33] Kolmer (J. A.) et Kast (Clara C.). *Amer. Journ. of Syph.*, **16**, 1932, p. 535.
[34] Levaditi (C.), Stroesco (G.) et Vaisman (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 1024.
[35] Levaditi (C.) et Vaisman (A.). *Paris-Médical*, n° 10, 1938, p. 193.

[36] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et ROUSSET-CHABAUD (D.). *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 1937, p. 925 ; *Bull. Acad. Méd.* (Paris), **120**, 1938, p. 191.
[37] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et STROESCO (G.). *Bull. Acad. Méd.* (Paris), **117**, 1937, p. 509.
[38] ROSS (H.). *Brit. med. Journ.*, **2**, 1912, p. 1651.
[39] STROESCO (G.) et VAISMAN (A.). *Bull. Acad. Méd.* (Paris), **115**, 1936, p. 657 ; *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 399 ; Ces *Annales*, **59**, 1937, p. 403.
[40] TANI (T.) et OGIUTI (K.). *The Jap. Journ. of exper. Med.*, **13**, 1935, p. 75.
[41] VAN CANNEYT (J.). *Bull. Soc. belge Ophtalmol.*, n° 59, 1929, p. 87.
[42] VAN HAELST (J.). Ces *Annales*, **49**, 1932, p. 778.
[43] VAN HAELST (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, p. 1535.
[44] VAN HAELST (J.). *Arch. intern. Méd. exp.*, **8**, 1933, p. 543
[45] VAN HAELST (J.). Ces *Annales*, **51**, 1933, p. 714.

ETUDE SUR LE VENIN BLANC DE *VIPERA ASPIS*

par E. CÉSARI et PAUL BOQUET.

(*Institut Pasteur.*)

Au cours des prélèvements de venins effectués chaque année, de mars à novembre, sur des serpents vivants adressés de diverses régions de la France à l'Institut Pasteur pour la préparation du sérum antivenimeux, nous avons constaté que les vipères provenant du département du Gers (région de Puycasquier et Monferran-Saves) fournissaient constamment un venin complètement incolore, alors que les sécrétions venimeuses des vipères capturées dans les autres départements présentent toujours une coloration franchement jaune. Les vipères du Gers possédant tous les caractères zoologiques de l'espèce *Vipera aspis*, il nous a paru intéressant de rechercher si à cette singularité correspondaient des propriétés physiologiques particulières du venin blanc.

La sécrétion obtenue par pression latérale des glandes venimeuses de la vipère du Gers, se solidifie par dessiccation en lamelles blanches, opaques, très solubles dans l'eau.

Un mélange des sécrétions desséchées et broyées de 373 vipères capturées en 1935 (1) a constitué notre venin blanc étalon dont la toxicité, les activités diastasiques et les propriétés antigéniques ont été étudiées par comparaison avec l'échantillon étalon de venin jaune, dont nous avons précédemment décrit les caractères physiopathologiques.

MESURE DE LA TOXICITÉ.

A. EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — 1° *Administration du venin blanc par la voie sanguine.* — Le venin blanc de vipère,

(1) Toutes les expériences sur la toxicité du venin blanc ont été effectuées en 1936.

dilué dans l'eau physiologique et injecté dans la veine de lapins de 2.000 à 2.500 grammes, tue ces animaux à la dose de 0 milligr. 30 par kilogramme (dose minima mortelle de venin jaune, 0 milligr. 35). La mort survenant en quelques instants, le tableau clinique ne peut pas être différent de celui qui traduit l'intoxication suraiguë par le venin jaune. A peine l'injection est-elle terminée, que l'animal présente une polypnée intense, tombe et meurt dans une crise convulsive au bout de deux à cinq minutes. A l'autopsie, les poumons sont exsangues, le cœur droit, la veine porte et la veine cave gorgés de caillots sanguins, le foie et la rate fortement congestionnés.

Les doses inférieures à 0 milligr. 30 par kilogramme ne déterminent que des troubles passagers.

Chauffé trente minutes à 60°, le venin blanc perd un peu de sa toxicité, mais les symptômes de l'envenimation demeurent les mêmes.

Porté trente minutes à la température de 70° il détermine, par contre, des accidents très différents de ceux qui font suite à l'injection intraveineuse de venin jaune chauffé à la même température. Alors que ce dernier venin tue rapidement par coagulation massive du sang, le venin blanc chauffé à 70° provoque une intoxication lentement mortelle, où prédominent les effets neurotoxiques. Ainsi, l'injection intraveineuse à un lapin de 2.000 grammes, de 4 milligrammes de venin blanc porté à cette température, entraîne la mort de l'animal en seize heures environ (la dose minima mortelle de venin jaune est de 2 milligr. 5 par kilogramme ; elle tue en cinq minutes). Après l'injection, la respiration devient dyspnéique, le corps est fréquemment secoué par des crises convulsives ; peu à peu les membres antérieurs se paralysent, puis l'animal s'affaisse et tombe dans un coma qui se prolonge pendant plusieurs heures, la mort survenant après quelques inspirations bruyantes. Les lésions notées à l'autopsie sont les suivantes : congestion intense du foie et de la rate ; les veines qui sillonnent l'intestin sont violacées et turgescentes ; absence de coagulation du sang.

2° *Administration du venin par la voie sous-cutanée.* —

Sous la peau, il faut injecter 20 milligrammes de venin blanc fraîchement dilué pour tuer en moins de vingt-quatre heures un lapin de 2 kilogrammes, alors que 16 milligrammes de venin jaune suffisent. Au point injecté apparaît un œdème modéré ; les organes abdominaux sont le siège d'une congestion diffuse. Des doses moindres provoquent localement de l'œdème, avec, parfois, un début d'escharification des tissus. Certains animaux éprouvés succombent tardivement, sans que l'on puisse attribuer sûrement leur mort à l'intoxication venimeuse.

Porté pendant trente minutes à la température de 70°, le venin blanc très atténué tue encore le lapin à la dose de 40 milligrammes par kilogramme. Dans les mêmes conditions, le venin jaune se montre atoxique.

Dans toutes ces expériences, nous avons constaté que l'introduction de venin blanc frais ou chauffé, sous la peau, ne s'accompagne jamais de lésions cutanées importantes. Les altérations locales consistent en un œdème modéré sur lequel se développe un processus nécrotique dépassant rarement le stade de la tache violette décrite par Maurice Nicolle. Ces lésions discrètes ne peuvent être comparées à l'œdème sanguinolent, mou, étendu, et à l'escharification rapide et profonde des tissus que provoque l'injection de venin jaune.

B. Expériences sur le cobaye. — 1° *Administration du venin blanc par la voie sanguine.* — Il suffit d'injecter 0 milligr. 5 de venin dans la veine jugulaire d'un cobaye de 420 à 450 grammes pour tuer l'animal en moins de dix minutes.

Aussitôt après l'injection, le cobaye titube et tombe ; ses pattes sont agitées de mouvements spasmodiques ; le réflexe cornéen disparaît, l'animal entre dans le coma et meurt en quelques instants. Les battements des oreillettes persistent quelque temps après la mort ; le cœur, la veine porte et la veine cave contiennent parfois de petits caillots ; les viscères sont violemment congestionnés. Ces lésions sont identiques à celles que détermine l'injection intraveineuse au même animal d'une égale quantité de venin jaune ; mais alors que,

mesurée chez le cobaye par injection intraveineuse, la toxicité du venin jaune chauffé pendant trente minutes à 60° est considérablement atténuée, le chauffage à cette température n'affaiblit pas sensiblement la toxicité du venin blanc.

2° *Administration du venin blanc par la voie sous-cutanée.* — Une dilution de venin blanc fraîchement préparée et injectée sous la peau à la dose de 1 à 2 milligrammes, tue en vingt-quatre heures le cobaye de 450 grammes (dose mortelle de venin jaune : 2 milligrammes environ). Comme chez le lapin, les signes locaux sont discrets et se réduisent à un œdème mou, à une tache cutanée violette, évoluant rarement vers la nécrose.

C. Expériences sur la souris. — 1° *Administration du venin par la voie sanguine.* — Les souris blanches (pesant de 18 à 22 grammes) qui reçoivent 0 milligr. 1 de venin blanc dans la veine de la queue, restent immobiles, dyspnéiques, et meurent en trente minutes environ (la même dose de venin jaune détermine des effets analogues).

2° *Administration du venin par la voie sous-cutanée.* — Sous la peau, le venin blanc provoque la mort en trois heures à la dose de 1 milligramme. A cette dose, le venin jaune tue en une heure environ.

Mme Phisalix a récemment signalé l'absence d'activité nécrosante du venin blanc à l'égard des souris injectées par voie sous-cutanée.

Mesure des activités diastasiques.

Les pouvoirs coagulant et hémolytique ont été appréciés *in vitro*, selon la technique antérieurement décrite. Vis-à-vis du plasma de cheval, le venin blanc se montre, à faible dose moins coagulant, et à forte dose moins anticoagulant que le venin jaune (tableau I). En présence de sérum, il lyse moins activement les globules rouges de cheval que ce dernier (tableau II).

TABLEAU I.

NUMÉROS des tubes	DOSES de venin en milligrammes	RÉSULTATS APRÈS 30 MINUTES A 37°			
		Venin blanc		Venin jaune	
		frais	chauffé 30 minutes à 60°	frais	chauffé 30 minutes à 60°
1	0,0005	0	0	0	0
2	0,001	0	0	C	0
3	0,0025	0	0	C	C
4	0,005	0	0	C	C
5	0,01	*c*	0	C	C
6	0,025	*c*	0	C	C
7	0,05	C	0	C	*c*
8	0,1	C	0	C	*c*
9	0,25	C	0	*c*	*c*
10	0,5	C	C	0	*c*
11	1	*c*	*c*	0	0
12	2,5	0	0	0	0
Témoin . .	0	0	0	0	0

C, coagulation totale; *c*, coagulation partielle, 0, absence de coagulation

TABLEAU II.

NUMÉROS DES TUBES	DOSES DE VENIN en milligramme	RÉSULTATS APRÈS 30 MINUTES A 37°	
		Venin blanc	Venin jaune
1	0,00015	0	0
2	0,00035	0	*h*
3	0,0005	0	H
4	0,0015	*h*	H
5	0,0035	H	H
6	0,005	H	H
Témoin	0	0	0

H, hémolyse totale, *h*, hémolyse partielle, 0, absence d'hémolyse.

PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES.

a) IMMUNITÉ ACTIVE. — Traité par le ricinoléate de soude dilué au 1/900, en milieu légèrement alcalin (pH 7,6), le venin blanc se comporte comme le venin jaune. Après un séjour de vingt-quatre heures à 37°, il perd ses propriétés toxiques sans que ses qualités antigéniques soient abolies.

Deux lapins qui avaient reçu en trois injections intraveineuses 12 milligrammes de venin blanc de *Vipera aspis* ricinoléaté, à raison d'une injection par semaine, ont résisté à l'injection intraveineuse pratiquée huit jours plus tard, de deux doses minima mortelles de venin blanc (lapin n° 1) et de deux doses minima mortelles de venin jaune (lapin n° 2).

Si le venin blanc de *Vipera aspis* confère aux animaux une immunité appréciable à l'égard du venin homologue et du venin jaune de vipère, inversement, l'immunité active développée à la suite d'injections de venin jaune, protège contre les effets des deux variétés de venin.

Quatre lapins immunisés par trois injections intraveineuses de 4 milligrammes chacune, de venin jaune ricinoléaté au 1/900, à raison d'une injection par semaine, résistent huit jours après la dernière injection immunisante à l'épreuve intraveineuse de trois doses minima mortelles de venin jaune (lapin n° 1), et de deux, trois et quatre doses minima mortelles de venin blanc (lapins n^{os} 2, 3, 4).

b) Immunité passive. — Les essais de neutralisation de la toxicité globale *in vivo* et des actions diastasiques *in vitro* du venin blanc de *V. aspis* à l'aide de notre sérum étalon antivipérin 861 [anti *V. aspis* + *V. berus*] (2), nous ont permis de constater que ce sérum jouit, tant à l'égard du venin blanc que du venin jaune, de propriétés neutralisantes sensiblement égales : lorsqu'on injecte à un lapin de 2.000 grammes environ un mélange, laissé trente minutes à l'étuve, de 10 doses mortelles de venin de vipère blanc ou jaune, et de sérum antivipérin 861 en proportions convenables (0 c. c. 4 par milligramme de venin), l'animal survit.

Le sérum 861 inhibe *in vitro* les effets coagulants et hémolytiques du venin blanc de *Vipera aspis*.

Traité par le formol à faible dose, selon la méthode de G. Ramon, le venin blanc de vipère se transforme en anavenin. Une solution contenant 10 milligrammes de ce venin

(2) Sérum de cheval hyperimmunisé par des injections de doses croissantes d'un mélange de venin de *V. aspis* et *V. berus* L'antigène utilisé contient une petite quantité de venin blanc.

par centimètre cube, additionnée de 4 p. 1.000 de formol, est devenue atoxique pour le lapin (épreuve intraveineuse) après un séjour de quatorze jours à 37°.

La présence des mêmes antigènes dans les deux variétés de venin est mise en évidence non seulement par les résultats des épreuves croisées d'immunité active, mais encore par le neutralisation de la toxicité des deux sortes de venins au moyen du sérum spécifique préparé à l'aide d'un anavenin obtenu soit avec le venin blanc, soit avec le venin jaune.

a) Quatre lapins (de 2.500 grammes environ) d'un premier lot, reçoivent par voie veineuse des doses croissantes d'anavenin préparé à partir du venin blanc de Vipère, soit 5, 8, 10, 13, 16 et 20 milligrammes de venin formolé à 4 p. 1.000, à raison d'une injection par semaine. Trois succombent au cours de l'immunisation. Le quatrième lapin est saigné dix jours après la dernière injection d'antigène. Son sérum neutralise 1 milligramme de venin jaune de vipère à la dose de 4 cent. cubes, et 1 milligramme de venin blanc homologue à la dose de 3 cent. cubes après trente minutes de contact à 37°, l'épreuve de la toxicité étant effectuée, selon la technique indiquée antérieurement, sur le lapin, par injection intraveineuse.

b) Dans les mêmes conditions, 3 des 4 lapins d'un second lot ayant reçu les mêmes quantités d'anavenin préparé à partir du venin jaune, fournissent un sérum qui neutralise indifféremment 1 milligramme de venin jaune homologue, ou 1 milligramme de venin blanc hétérologue à la dose de 2 cent. cubes.

Conclusions.

Le venin blanc des vipères (*V. aspis*) capturées dans le département du Gers possède certaines propriétés toxiques qui le distinguent du venin jaune des vipères de la même espèce.

In vitro, le venin blanc se montre moins coagulant et moins hémolytique que le venin jaune.

In vivo, il est beaucoup moins escharifiant, mais plus neurotoxique. Cette dernière constatation ressort des effets du chauffage sur les deux venins. Porté à 70° le venin blanc exerce encore, sur le lapin éprouvé par voie sous-cutanée, ses effets neurotoxiques, alors que le venin jaune traité de la même façon et injecté par la même voie au même animal, est sans action. Ces constatations appuient les observations antérieures de C. Phisalix et G. Bertrand, puis de J. Vellard, sur

les variations du pouvoir toxique des venins élaborés par des serpents appartenant à une même espèce selon les régions où ils sont capturés.

Le sérum spécifique préparé contre le venin blanc exerce son activité antitoxique à l'égard de l'antigène homologue (venin blanc) et de l'antigène hétérologue (venin jaune).

BIBLIOGRAPHIE

E. CESARI et PAUL BOQUET. Ces *Annales*, **55**, 1935, p. 307 ; *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 1937, p. 231 et **125**, 1937, p. 570.
E. CESARI, J. BAUCHE et PAUL BOQUET. *C. R. Acad. Sc.*, **201**, 1935, p. 683.
C. PHISALIX et G. BERTRAND. *Arch. Physiol.*, n° 2, 1895, p 260.
M. PHISALIX. *Bull. Soc. Zool. de France*, **64**, 1939, p. 187.
J. VELLARD. *C. R. Soc. Biol.*, **130** 1939, p. 463.

RÉPARTITION DE L'AZOTE ET MÉTABOLISME AZOTÉ DANS LA TOXINOGENÈSE TÉTANIQUE

par A.-R. PRÉVOT et H.-J. BOORSMA.

(*Institut Pasteur. Service du Tétanos.*)

Le fait capital qui frappe tous les producteurs de toxine tétanique est la fréquence et l'amplitude des variations du titre de la toxine obtenue, même avec un procédé bien réglé et appliqué rigoureusement de la même façon, tout au moins en apparence.

Ces variations ont déjà fait l'objet de nombreuses recherches dans notre service [1] et ont été rapportées à deux ordres de causes : causes tenant à la souche, et causes tenant au milieu. Parmi ces dernières, nous nous sommes attachés tout spécialement depuis un an à l'étude des fluctuations de la toxine pouvant être rapportées aux variations des teneurs en azote des divers constituants du bouillon, à leur répartition et à leur équilibre réciproque.

Le début de ces recherches a été réalisé en collaboration avec A. Berthelot et G. Amoureux [2]. Nous avons constaté avec eux, au cours d'analyses d'azote aminé et ammoniacal, portant sur 16 échantillons de bouillons préparés suivant le même procédé, que la teneur en N aminé variait de 0 gr. 59 à 1 gr. 295 par litre de bouillon, alors que la teneur en N ammoniacal variait de 0 gr. 029 à 0 gr. 17 par litre de bouillon, ce qui porte les fluctuations du total N (NH^2 + NH^3) de 0 gr. 67 à 1 gr. 372 par litre. Les toxines correspondant à ces 16 échantillons de bouillon variaient de 0 à 33 unités antigéniques. Or, ces variations de la toxine n'étaient parallèles à aucune des formes d'azote étudiées. Nous en avions conclu qu'il était nécessaire d'aborder ce problème très complexe avec des méthodes plus incisives, et c'est avec A. Berthelot et

G. Amoureux que nous avons établi le plan de recherches que nous allons exposer plus loin (1).

Par ailleurs, nos recherches bibliographiques nous montraient que le sujet, tel qu'il se présentait à nous, n'avait pas encore reçu de solution satisfaisante. Les recherches de Wagner, Dosier et Meyer (1924) [3] ont eu pour but l'étude du métabolisme général du *Pl. tetani* pour lui-même et sans aucun rapport avec la toxinogenèse. Elles ont surtout mis en relief les données quantitatives générales du métabolisme de cette bactérie, en particulier la production d'amino-acides et d'ammoniaque.

Le problème s'est donc présenté à nous presque entier. Nous allons d'abord exposer la technique que nous avons suivie, tant pour la préparation de la toxine tétanique elle-même que pour les analyses biochimiques que nous avons pratiquées.

Préparation de la toxine tétanique.

Nous rappellerons ici les caractéristiques principales de la méthode de préparation de la toxine tétanique que l'un de nous [4] a mise au point en 1937-1938.

Nous utilisons un bouillon de viande et de foie de bœuf dérivé du milieu de Stickell et Meyer [5] dont voici le mode de préparation :

1° Préparation du bouillon. — On hache finement 3 kilogr. 700 de viande de bœuf dégraissée et 900 grammes de foie de bœuf frais, et on ajoute 18 litres d'eau de robinet. On acidifie avec 150 cent. cubes d'HCl concentré pur, on ajoute 10 grammes de pepsine Vaillant titre 500, et on porte au bain-marie à 48° pendant dix-huit heures. On chauffe ensuite à 85° pour arrêter la digestion, et on filtre le jus décanté sur papier Durieux mou. On ajuste le pH à 5,8 au rouge de méthyle avec de la lessive de soude pure. On précipite à 100° (bain-marie à vapeur) pendant dix minutes et on refiltre sur papier Durieux demi-dur. On répartit dans des fioles d'Erlenmeyer de 3 litres en pyrex à raison de 2 lit. 600 de bouillon par fiole. On ajoute 20 grammes de glucose par fiole, on bouche au coton cardé chapeauté de papier parchemin et on stérilise vingt-six minutes à 110°.

On laisse refroidir lentement dans une pièce fraîche et obscure jusqu'à 33°.

(1) Ces recherches n'ont pu être exécutées que grâce à l'obligeance de M. G. Ramon qui nous a fourni les sérums antitétaniques étalons nécessaires, ce dont nous le remercions très vivement ici.

On ensemence et on porte à l'étuve à 33° pendant onze jours environ. On agite un peu tous les jours à partir du troisième jour.

2° Préparation des souches. — La souche tétanique « L » est entretenue sur bouillon semblable au précédent, additionné de 5 grammes de cervelle de veau pour 8 cent. cubes de bouillon en tubes désaérés à la machine à vide, scellés et conservés à l'obscurité à 18-20°.

Pour en tirer des souches d'ensemencement, on choisit une souche de trois mois environ, provenant d'une lignée ayant donné une toxine supérieure à 42 unités. On ensemence de cette souche des souches-filles en tubes désaérés et scellés, dont on tire des souches petites-filles en bouillons de cervelle profonds qui servent à l'ensemencement des fioles de bouillon à raison de 1 souche par fiole.

Méthodes analytiques employées : Sur le conseil de A. Berthelot nous avons suivi le plan de recherches et d'analyses suivant :

1° Nous avons déterminé l'azote total par la méthode de Kjeldahl sur 5 cent. cubes de bouillon prélevé dans chaque production.

2° Nous avons déterminé ensuite l'azote précipitable par l'acide trichloracétique à froid.

3° Puis l'azote précipitable par SO^4Zn à saturation en milieu acide.

4° Puis l'azote précipitable par l'acide phosphotungstique en milieu sulfurique.

5° Les groupements aminés et ammoniacaux ont été titrés par la méthode de Sörensen-Froideveaux.

6° L'azote ammoniacal a été titré par la méthode de Foreman.

7° Enfin, l'azote des acides aminés et des polypeptides a été déterminé par la méthode de Martens, et l'azote des acides diaminés calculé par la même méthode.

Résultats.

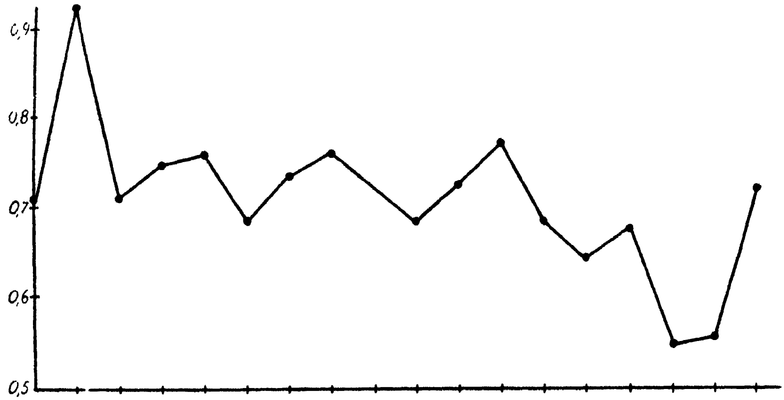
Nous avons rassemblé les résultats des analyses pratiquées sur 12 échantillons de bouillon dans le tableau I. Les teneurs sont rapportées à 1 gramme d'azote total.

Le but que nous poursuivons étant de trouver la ou les formes d'azote favorables à la toxinogenèse tétanique, nous avons dressé pour chaque forme un graphique que nous avons

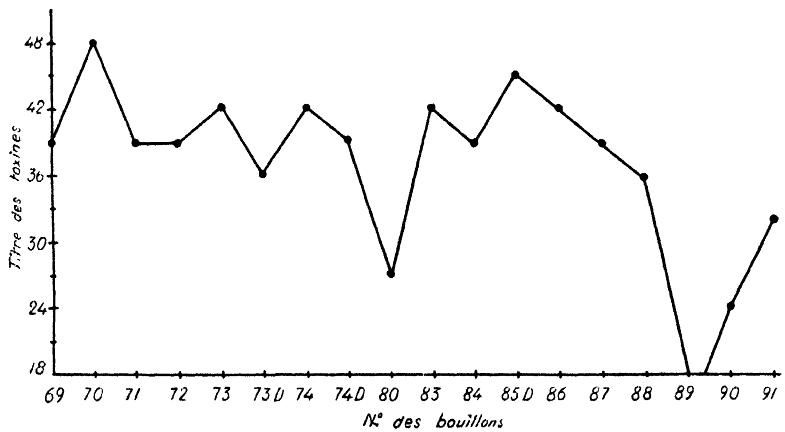
Tableau 1. — Répartition de l'azote dans les bouillons destinés au tétanos.

NUMÉRO DES BOUILLONS	69	70	71	72	73	73 D_{14}	74	74 D_{14}	80	83	84	85 D_{14}
TITRE DES TOXINES	39	48	39	39	42	33	42	39	27	42	39	45
Azote total	0,619	0,643	0,664	0,640	0,637	0,600	0,635	0,586	0,666	0,609	0,655	0,631
Azote phosphotungstique	0,491	0,506	0,500	0,524	0,528		0,501	0,476	0,504	0,461	0,537	0,526
Azote protéosique (SO^4Zn)	0,158	0,154	0,160	0,214	0,330	0,277	0,265	0,288	0,233	0,211	0,340	0,249
Azote trichloracétique	0,116	0,154	0,112	0,141	0,153	0,169	0,134	0,133	0,139	0,148	0,178	0,147
Azote Sorensen	0,076	0,069	0,088	0,074	0,076	0,066	0,070	0,074	0,090	0,081	0,059	0,068
Azote ammoniacal (Foreman)	0,011	0,015	0,016	0,012	0,010	0,017	0,013	0,008	0,016	0,014	0,013	0,017
Azote acides diaminés calculé par la méthode de Martens	0,0037	0,0049	0,012	0,0019	0,006	0,006	0,008	0,010	0,006	0,012		0,006
Azote acides aminés (Martens)	0,0078	0,0028	0,027	0,026	0,021	0,022	0,022	0,018	0,040	0,040	0,021	0,013
Azote polypeptides (Martens)	0,115	0,099	0,0101	0,082	0,086	0,063	0,085	0,083	0,096	0,090	0,076	0,070
COOH acides aminés et polypeptides	0,396	0,330	0,411	0,346	0,343	0,273	0,343	0,324	0,438	0,418	0,313	0,261
Rapport $\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$	0,72	0,93	0,72	0,75	0,76	0,69	0,74	0,76	0,61	0,69	0,72	0,78

comparé avec le graphique indiquant pour chaque échantillon de bouillon le titre de la toxine tétanique correspondante, exprimé en unités antigéniques de Ramon.



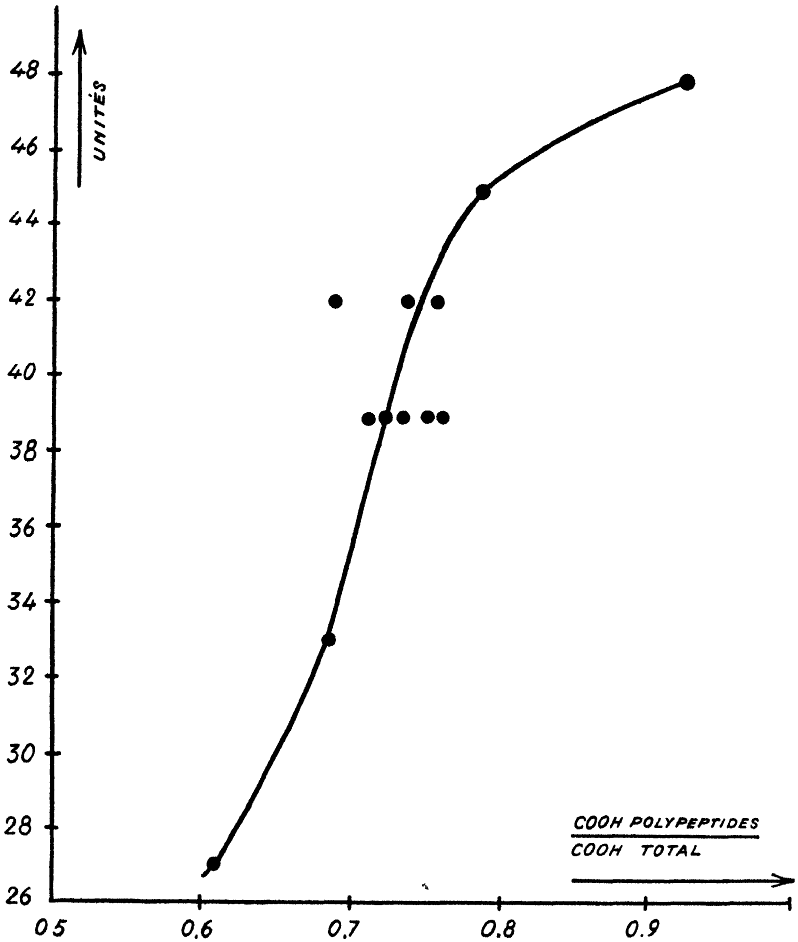
GRAPHIQUE 1. — Fluctuation du rapport $\frac{CO^2H \text{ polypeptides}}{CO^2H \text{ total}}$ des bouillons nos 69 à 91.



GRAPHIQUE 2. — Fluctuations des toxines nos 69 à 91.

En comparant ces séries de graphiques, nous avons constaté que les teneurs : 1° d'azote total ; 2° d'azote phosphotungstique; 3° d'azote protéosique (SO^4Zn) ; 4° d'azote trichloracétique ; 5° d'azote Sörensen ; 6° d'azote ammoniacal

Foreman ; 7° d'azote Martens, n'offraient aucune proportionnalité avec les titres des toxines correspondantes. C'est alors que l'idée nous est venue de rechercher cette proportionnalité



GRAPHIQUE 3. — Variations de la toxine en fonction du quotient $\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$.

non pas avec les teneurs elles-mêmes, mais avec des quotients exprimant l'équilibre réciproque soit de certaines formes d'azote, soit plus simplement de certains groupes de ces

formes. Après avoir tenté plusieurs combinaisons, c'est dans le rapport :

$$\frac{\text{COOH polypeptides titrables}}{\text{COOH aminés, diaminés, polypeptides titrables}}$$

dont les éléments sont titrables par la méthode de Martens que nous avons trouvé la seule *variable dont les fluctuations se sont montrées parallèles aux fluctuations de la toxine.*

Nous reproduisons ici les deux graphiques juxtaposés, le graphique I indiquant les fluctuations du quotient :

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}},$$

le graphique II les fluctuations des toxines correspondantes des séries 69 à 91. Nous spécifions bien qu'il ne s'agit là que de graphiques de travail et non d'une courbe de variation d'un élément en fonction de l'autre. Mais tels qu'ils se présentent, ils indiquent clairement qu'il y a un parallélisme certain entre ces deux éléments.

En construisant la courbe de variation du titre de la toxine en fonction de ce quotient (graphique III), nous obtenons une courbe rapidement ascendante dans sa partie initiale, avec un grand nombre de points bien groupés autour des coordonnées suivantes :

Abscisses : 0,72 pour le quotient

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$$

Ordonnées : 42 unités.

Or, depuis un an, la majorité de nos toxines titraient 42 unités. Il semble donc qu'avec notre méthode, 42 unités soit le titre le plus fréquemment atteint. Au-dessus de ces coordonnées, la courbe s'infléchit très rapidement et devient asymptote à l'horizontale. Or les faits observés depuis un an correspondent bien à cet aspect : au fur et à mesure que le quotient

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$$

se rapproche de sa valeur maxima qui est 1, les titres des toxines doivent se rapprocher de leurs valeurs maxima : et, en effet, depuis que nous utilisons cette méthode, nous n'avons jamais observé de toxines titrant plus de 48 à 50 unités dans les bouillons où il n'y a pas eu addition de substances stimulantes (extraits de foie, de cervelle, vitamines B1, B2 ou PP) [6].

On en arrive finalement à la conclusion que le plafond du titre antigénique des toxines tétaniques est d'environ 50 unités pour la méthode que nous employons. Les titres de 54, 57, 60 et 65 unités que nous avons souvent obtenus l'ont été grâce à l'addition de substances stimulantes, et ces faits montrent toute la complexité du problème de la toxinogenèse : il n'y a pas que l'équilibre azoté suivant le quotient

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$$

qui commande le titre des toxines. La teneur du bouillon en vitamines est un deuxième facteur important de l'élaboration de la toxine tétanique, et nous avons observé à ce sujet plusieurs ordres de faits :

1° La détermination des vitamines existant normalement dans les bouillons (vitamine PP par la méthode de Lwoff et Quérido [7] ; lactoflavine par la méthode d'Emmerie) montre que leur taux y est très variable.

2° L'addition extemporanée de vitamines synthétiques avant la stérilisation des bouillons amène des augmentations importantes du titre des toxines [6] de 3 à 18 unités par centimètre cube.

3° Eventuellement l'addition d'un extrait organique peut corriger la conséquence d'un quotient

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$$

trop faible ; pour ne citer que deux exemples : dans l'expérience n° 80 la toxine-témoin (sans addition) est de 27 unités pour un quotient = 0,61, très faible ; l'addition d'extrait aqueux de cervelle donne une toxine titrant 36 unités, soit

une augmentation de 9 unités par centimètre cube. Dans l'expérience n° 87, pour un quotient = 0,63, la toxine-témoin (sans addition) titre 39 unités, et la toxine additionnée d'extrait de foie titre 54 unités, soit un gain de 15 unités au centimètre cube.

Ces faits indiquent nettement les aspects multiples de l'influence de la composition du milieu sur la toxinogenèse tétanique. Ils nous amènent d'ailleurs tout naturellement à exposer un troisième aspect du problème, tout aussi important : le métabolisme azoté au cours de la toxinogenèse.

Métabolisme azoté au cours de la toxinogenèse.

Le *Pl. tetani* n'est généralement pas considéré comme une bactérie très protéolytique bien que la plupart des souches, dont la nôtre, liquéfient la gélatine. Cependant les protéines solubles peuvent lui servir de source azotée, mais nous ne possédions pas jusqu'ici de données quantitatives complètes sur le métabolisme de chacun des groupes azotés qu'il est capable d'attaquer. Ce travail nous a amenés à établir ces données quantitatives.

Nous avons exécuté cette recherche sur les bouillons tétaniques n^{os} 83 et 84 qui nous avaient donné respectivement les résultats suivants :

Toxine n° 83, titre 42 unités, dose minima mortelle 1/120.000 de centimètre cube pour le cobaye de 350 grammes.

Tableau II.

	Bouillon 83	Toxine 83	Bouillon 84	Toxine 84
Azote total	1	1	1	1
Azote phosphotungstique	0,757	0,763	0,820	0,786
Azote protéosique (SO^4Zn)	0,350	0,094	0,518	0,126
Azote précipitable par l'acide trichloracétique à froid	0.242	0,035	0,271	0,061
Azote ($NH^2 + NH^3$) [Sorensen]	0,132	0,281	0,090	0 183
Azote ammoniacal (Foreman)	0,029	0,200	0,020	0,131
Azote acides diaminés	0,020	0,020	0	0,001
Azote acides aminés	0,066	0,120	0,032	0,084
Azote des polypeptides	0,148	0,344	0,116	0,234

Toxine n° 84, titre 39 unités, dose minima mortelle 1/120.000 de centimètre cube pour le cobaye de 350 grammes.

L'analyse quantitative des diverses fractions azotées de la toxine a été faite après douze jours de culture à l'étuve. Nous avons rapporté ces chiffres dans le tableau II, où tout est calculé sur 1 gramme d'azote total.

On voit par ces chiffres que le *Pl. tetani* est capable d'attaquer fortement les protéoses solubles avec formation de polypeptides, d'acides aminés et d'ammoniaque, avec une prédominance très marquée des polypeptides.

Conclusions.

Dans les conditions d'expérience où nous nous sommes placés nous avons pu constater que la toxinogenèse tétanique est conditionnée surtout par un état d'équilibre des constituants azotés du milieu de culture, un rapport exprimant le stade de la digestion des polypeptides : en effet, le titre des toxines est fonction du quotient

$$\frac{\text{COOH polypeptides}}{\text{COOH total}}$$

déterminé par la méthode de Martens.

Ce quotient n'est pas le seul facteur inhérent au milieu de culture qui puisse agir sur la toxinogenèse. La teneur normale des bouillons en vitamines est aussi très importante.

Les valeurs trop faibles de chacun de ces facteurs peuvent être corrigées par l'addition d'extraits organiques ou de vitamines synthétiques B1, B2 et PP.

Enfin, même pour un quotient élevé donnant une toxine élevée, il est possible dans certains cas de provoquer une surélévation du titre de la toxine au-dessus de son plafond normal par l'addition de ces substances stimulantes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Prévot (A.-R.). Recherches sur la toxinogenèse tétanique. *Ier Congrès Intern. des Microbiol. de Langue Franç.* Ces *Ann.*, 1938, p. 36 *bis*.

[2] BERTHELOT (A.), PRÉVOT (A.-R.), AMOUREUX (G.) et BOORSMA (H.-J.). *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 1133.
[3] WAGNER, DOSIER et MEYER. *J. I. D.*, **34**, 1924, p. 63.
[4] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 685 ; *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 1166. — PRÉVOT (A.-R.) et POCHON (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 152. — PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 307. — PRÉVOT (A.-R.) et KIRCHHEINER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 840 ; *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 158. — PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Ac. Sc.*, **208**, 1939, p. 394.
[5] STICKELL et MEYER. *Journ. Inf. Dis.*, **23**, 1918, p. 68.
[6] PRÉVOT (A.-R.) et BOORSMA (H. J.). *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1254 et *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 468. — PRÉVOT (A.-R.) et KIRCHHEINER. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1429.
[7] LWOFF et QUÉRIDO. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1569.

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 63

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 63

Notices nécrologiques.

Le Gérant : G. MASSON.

Imprimé par l'Ancne Impie de la Cour d'Appel, A. MARETHEUX, Dir., 1, r Cassette, à Paris (France).

Date of Issue	Date of Issue	Date of Issue

GIPNLK—H-40 I.A.R.I.—29-4-55—15,000